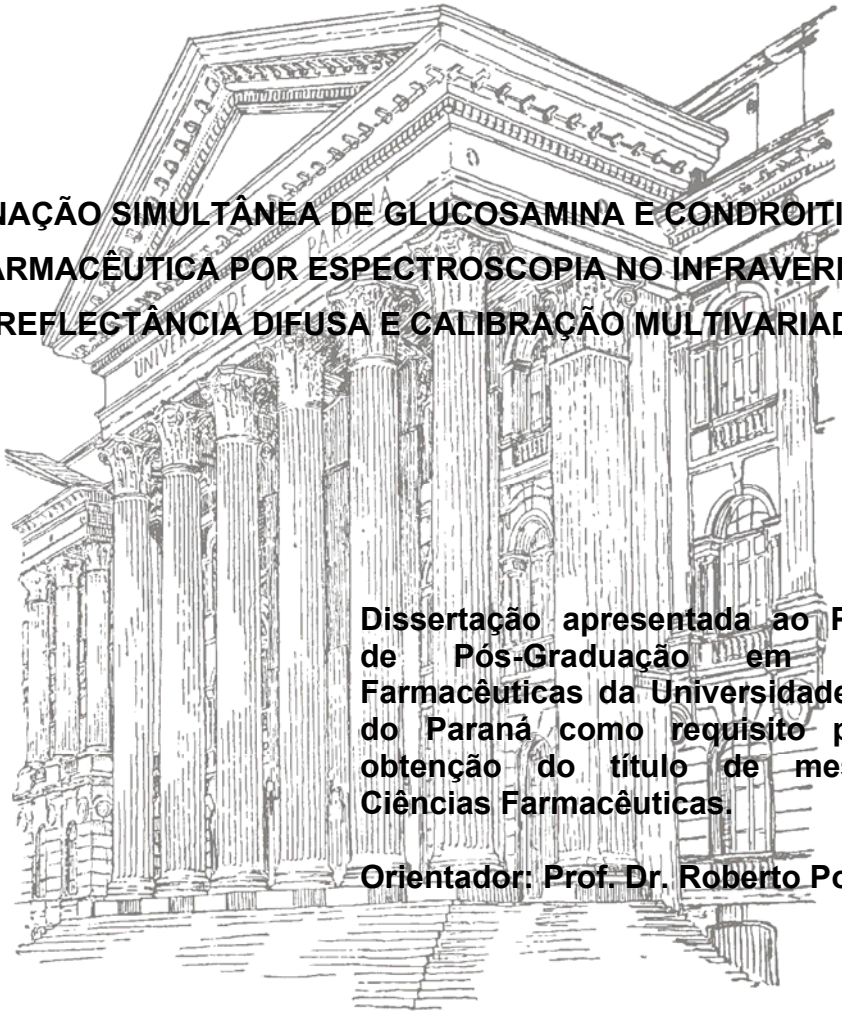


PAULA SILVIA ROSSIGNOLI

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLUCOSAMINA E CONDROITINA EM
FORMA FARMACÊUTICA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO
COM REFLECTÂNCIA DIFUSA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2006

PAULA SILVIA ROSSIGNOLI

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE GLUCOSAMINA E CONDROITINA EM
FORMA FARMACÊUTICA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO
COM REFLECTÂNCIA DIFUSA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2006

Aos meus pais e à minha irmã

“A vida é um incêndio: nela
dançamos, salamandras mágicas.”

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho encerra uma fase de muitas conquistas, somente possíveis porque não estive sozinha. Gostaria de agradecer àqueles que estiveram comigo ao longo desse caminho.

Ao meu pai, por nunca ter me deixado sem respostas.

À minha mãe, por sua força, coragem e seu cuidado com todos nós.

À minha irmã, pela amizade e cumplicidade de hoje, mas também pelas brigas de ontem.

Ao meu orientador e amigo Prof. Roberto Pontarolo, por ter acreditado no meu trabalho, dando-me a oportunidade necessária para que eu me aperfeiçoasse e me dedicasse ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Patrício Peralta-Zamora, por tornar possível esta pesquisa, permitindo que eu fizesse meus experimentos no Departamento de Química da UFPR.

Aos meus amigos e parceiros de trabalho. Rodrigo, por seu bom humor constante, pela paciência e por entender a minha ausência na farmácia. Renata (Rê), pelas longas conversas e palavras precisas. Liege (Li), pela parceria nas aulas, por seu empenho e sua competência. Gilcélia (Gil), pelo apoio e pela presença imprescindíveis e, sobretudo, pela grande generosidade, sem os quais esta pesquisa não teria sido possível.

A três grandes amigos, por provocarem em mim dúvidas e inquietações que me permitiram crescer. Airton, o primeiro responsável pelo caminho que percorri. Fernando, que, apesar da distância, foi um grande incentivador das minhas conquistas. Cassyano, com quem convivo e aprendo desde os tempos da graduação, e com quem divido projetos e realizações.

E a você, Zé, cuja presença me mostrou algo que eu já havia esquecido ou que ainda não sabia: como a vida pode ser leve!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 OSTEOARTRITE	4
3.1.1 Tratamento	6
3.2 GLUCOSAMINA	7
3.2.1 Aspectos Físico-Químicos da Glucosamina-6-Sulfato	8
3.3 CONDROITINA	8
3.3.1 Aspectos Físico-Químicos da Condroitina-6-Sulfato	10
3.4 ASSOCIAÇÃO DE GLUCOSAMINA E CONDROITINA	11
3.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	11
3.5.1 Reflectância Difusa	12
3.6 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	14
3.6.1 Métodos de Calibração Multivariada	18
3.6.1.1 Análise de componentes principais (PCA)	18
3.6.1.2 Regressão em componentes principais (PCR)	19
3.6.1.3 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR)	20
3.6.2 Validação do Modelo de Calibração	21
3.7 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NA ANÁLISE DE FÁRMACOS	22
3.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	33
3.8.1 Especificidade e Seletividade	35
3.8.2 Intervalo	35
3.8.3 Linearidade	36
3.8.4 Exatidão	36
3.8.5 Precisão	37

3.8.6 Robustez	39
3.8.7 Sensibilidade	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	41
4.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS	43
4.3 PLANEJAMENTO E PREPARO DAS MISTURAS	43
4.4 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS	47
4.5 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	47
4.5.1 Validação Externa	49
4.6 PRÉ-TRATAMENTO DOS DADOS	51
4.6.1 Derivação e Alisamento dos Espectros	51
4.6.2 Correção do Fator Multiplicativo do Sinal (MSC)	51
4.7 VALIDAÇÃO	52
4.7.1 Seletividade	52
4.7.2 Intervalo	52
4.7.3 Precisão	53
4.7.4 Exatidão	54
4.7.5 Parâmetros não avaliados	54
4.8 ANÁLISE DE MEDICAMENTOS	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 ESPECTRO NO INFRATERMELHO COM REFLECTÂNCIA DIFUSA	57
5.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	59
5.3 MODELOS DE CALIBRAÇÃO	62
5.3.1 Análise de Anomalias	63
5.3.2 Modelo 1	64
5.3.2.1 Seleção de variáveis latentes	65
5.3.3 Modelo 2	71
5.3.3.1 Seleção de variáveis latentes	72
5.3.4 Modelo 3	78
5.3.4.1 Seleção de variáveis latentes	79
5.3.5 Modelo 4	85
5.3.5.1 Seleção de variáveis latentes	86
5.4 PRÉ-TRATAMENTOS	92

5.5 SELEÇÃO DO MODELO.....	95
5.6 VALIDAÇÃO	97
5.6.1 Especificidade e seletividade	97
5.6.2 Precisão	98
5.6.2.1 Repetibilidade.....	98
5.6.2.2 Precisão intermediária.....	100
5.6.3 Exatidão	103
5.7 ANÁLISE DE MEDICAMENTOS	105
6 CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS.....	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Regiões espectrais do infravermelho	12
TABELA 2 - Conteúdo das 30 misturas utilizadas no desenvolvimento e na validação dos modelos de calibração multivariada	45
TABELA 3 - Concentrações de glucosamina-6-sulfato, condroitina-6-sulfato e estearato de magnésio nas 30 misturas utilizadas para o desenvolvimento e a validação do modelo de calibração multivariada	46
TABELA 4 - Misturas utilizadas no ensaio de precisão, exatidão e seletividade..	53
TABELA 5 - Esquema de diluição das amostras de medicamentos para obtenção da concentração de 500 mg de glucosamina e 400 mg de condroitina por grama de mistura.....	56
TABELA 6 - Amostras utilizadas na análise de componentes principais (PCA)...	60
TABELA 7 - Porcentagem de variância capturada pelo método PLSR para o modelo 1 para cada variável latente.....	67
TABELA 8 - Comparação dos erros médios de previsão na validação externa de acordo com o número de variáveis latentes utilizadas para o modelo 1	68
TABELA 9 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo 1 com 7 VL.....	68
TABELA 10 - Porcentagem de variância capturada pelo método PLSR para o modelo 2	74
TABELA 11 - Comparação dos erros médios de previsão na validação externa de acordo com o número de variáveis latentes utilizadas para o modelo 2	75
TABELA 12 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo 2 com 7 variáveis latentes.....	75
TABELA 13 - Porcentagem de variância capturada pelo método PLSR para o modelo 3	81
TABELA 14 - Comparação dos erros médios de previsão na validação externa de acordo com o número de variáveis latentes utilizadas para o modelo 3	82
TABELA 15 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo 3 com 5 variáveis latentes.....	82
TABELA 16 - Porcentagem de variância capturada pelo método PLS para o modelo 4	87
TABELA 17 - Comparação dos erros médios de previsão na validação externa de acordo com o número de variáveis latentes utilizadas para o modelo 4	88
TABELA 18 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo 4 com 5 variáveis latentes.....	88
TABELA 19 - Comparação dos erros médios de previsão dos quatro modelos de calibração multivariada desenvolvidos	89
TABELA 20 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo desenvolvido na região espectral de 6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500 cm^{-1} com pré-tratamento (MSC) e duas variáveis latentes.....	94
TABELA 21 – Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo desenvolvido na região espectral de 6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500 cm^{-1} utilizando-se 1º derivada e alisamento dos espectros e duas variáveis latentes	94

TABELA 22 - Comparação dos erros médios de previsão dos modelos desenvolvidos na região espectral de região espectral de 6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500 cm^{-1} sem pré-tratamento e com pré-tratamentos.	95
TABELA 23 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 1 no ensaio de repetibilidade.....	98
TABELA 24 - Resultados da determinação da glucosamina e condroitina na mistura 14 no ensaio de repetibilidade.....	99
TABELA 25 - Resultados da determinação da glucosamina e condroitina na mistura 24 no ensaio de repetibilidade.....	99
TABELA 26 - Resultados da determinação da glucosamina e condroitina na mistura 25 no ensaio de repetibilidade.....	100
TABELA 27 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 1 no ensaio de precisão intermediária.....	101
TABELA 28 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 14 no ensaio de precisão intermediária.....	101
TABELA 29 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 24 no ensaio de precisão intermediária.....	102
TABELA 30 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 25 no ensaio de precisão intermediária.....	102
TABELA 31 - Resultados do teor de glucosamina e condroitina para a mistura 1 no ensaio de recuperação.....	103
TABELA 32 - Resultados do teor de glucosamina e condroitina para a mistura 14 no ensaio de recuperação.....	104
TABELA 33 - Resultados do teor de glucosamina e condroitina para a mistura 24 no ensaio de recuperação.....	104
TABELA 34 - Resultados do teor de glucosamina e condroitina para a mistura 25 no ensaio de recuperação.....	105
TABELA 35 - Resultados de previsão para amostras de medicamentos obtidas no mercado utilizando-se o método desenvolvido e validado	106

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Artigos sobre uso da calibração multivariada publicados em revistas indexadas às bases de dados Medline e Science Direct.	23
QUADRO 2 - Ensaios necessários para a validação de métodos analíticos de acordo com a sua finalidade.....	34
QUADRO 3 - Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.	39
QUADRO 4 - Regiões espectrais consideradas na construção dos modelos de calibração.....	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Alterações provocadas nas articulações das mãos pela osteoartrite .	5
FIGURA 2 - Articulação normal do joelho (foto 1) e perda do espaço articular do joelho (foto 2) causada pela osteoartrite	5
FIGURA 3 - Estrutura química da glucosamina-6-sulfato.....	8
FIGURA 4 - Participação da condroitina na constituição de subunidades de proteoglicanos e o agregado de proteoglicanos presente na cartilagem articular..	9
FIGURA 5 - Estrutura química da condroitina-6-sulfato	10
FIGURA 6 - Desenho comparativo das reflexões especular e difusa.....	13
FIGURA 7 - Esquema do processo da calibração multivariada.....	16
FIGURA 8 - Matrizes de espectros e concentrações que constituem o conjunto de calibração.....	17
FIGURA 9 - Esquema representando as componentes principais (PC1 e PC2) e as variáveis originais (x e y).	19
FIGURA 10 - Fluxograma geral de desenvolvimento e validação de método para determinação simultânea de glucosamina sulfato e condroitina sulfato utilizando-se espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa e calibração multivariada.....	42
FIGURA 11 - Planejamento gráfico das concentrações das misturas de glucosamina 6-sulfato e condroitina 6-sulfato utilizadas no desenvolvimento e na validação externa dos modelos de calibração multivariada.	44
FIGURA 12 - Fluxograma do desenvolvimento, validação externa dos modelos de calibração e seleção do número ideal de variáveis latentes	50
FIGURA 13 - Espectro no infravermelho com reflectância difusa da glucosamina-6-sulfato	57
FIGURA 14 - Espectro no infravermelho com reflectância difusa da condroitina-6-sulfato.....	58
FIGURA 15 - Espectros no infravermelho com reflectância difusa da glucosamina-6-sulfato, condroitina-6-sulfato e da mistura 14.....	59
FIGURA 16 - Gráfico dos escores de PC1 X PC2 da análise de componentes principais utilizando espectros de glucosamina-6-sulfato, condroitina-6-sulfato, estearato de magnésio e das misturas 2, 7, 14 e 27	61
FIGURA 17 - Espectro no infravermelho com reflectância difusa das 30 misturas utilizadas para o desenvolvimento e a validação do modelo de calibração multivariada.....	62
FIGURA 18 - Análise de anomalias na construção do modelo 1 de calibração multivariada.....	63
FIGURA 19 - Espectros no infravermelho médio com reflectância difusa das misturas utilizadas no desenvolvimento do modelo 1 de calibração multivariada.	65
FIGURA 20 - Soma dos quadrados do erro de previsão PRESS em função do número de variáveis latentes para o modelo 1	66
FIGURA 21 - Coeficientes de regressão em função do número de variáveis analisadas no conjunto de calibração do modelo 1 com 7 variáveis latentes	69
FIGURA 22 - Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de student na construção do modelo 1 com 7 variáveis latentes.....	70

FIGURA 23 - Gráfico de valores reais por valores previstos obtidos durante a validação interna cruzada utilizando o sistema “leave-one-out” para o modelo 1	71
FIGURA 24 - Espectros no infravermelho médio com reflectância difusa das misturas utilizadas no desenvolvimento do modelo 2 de calibração multivariada	72
FIGURA 25 - Soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS) em função do número de variáveis latentes para o modelo 2.....	73
FIGURA 26 - Coeficientes de regressão em função do número de variáveis analisadas no conjunto de calibração do modelo 2 com 7 variáveis latentes	76
FIGURA 27 - Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de student na construção do modelo 2 com 7 variáveis latentes.....	77
FIGURA 28 - Gráfico de valores reais por valores previstos obtidos durante a validação interna cruzada utilizando o sistema “leave-one-out” para o modelo 2	78
FIGURA 29 - Espectro no infravermelho médio com reflectância difusa das misturas utilizadas no desenvolvimento do modelo 3 de calibração multivariada	79
FIGURA 30 - Soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS) em função do número de variáveis latentes para o modelo 3.....	80
FIGURA 31 - Coeficientes de regressão em função do número de variáveis analisadas no conjunto de calibração do modelo 3 com 5 variáveis latentes	83
FIGURA 32 - Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de student na construção do modelo 3 com 5 variáveis latentes.....	84
FIGURA 33 - Gráfico de valores reais por valores previstos obtidos durante a validação interna cruzada utilizando-se o sistema “leave-one-out” para o modelo 3	85
FIGURA 34 - Soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS) em função do número de variáveis latentes do modelo 4	86
FIGURA 35 - Coeficientes de regressão em função do número de variáveis analisadas no conjunto de calibração do modelo 4 com 5 variáveis	90
FIGURA 36 - Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de student na construção do modelo 4 com 5 variáveis latentes.....	91
FIGURA 37 - Gráfico de valores reais por valores previstos obtidos durante a validação interna cruzada utilizando-se o sistema “leave-one-out” para o modelo 4.	92
FIGURA 38 - Desenho esquemático do erro de predição em função do número de variáveis latentes.....	96
FIGURA 39 – Espectros no infravermelho com reflectância difusa dos medicamentos manipulados, do medicamento industrializado e da mistura	14..108

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AINES – Antiinflamatórios não Esteroidais

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CONDRO – Condroitina

CV – Coeficiente de variação

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

GLUCO – Glucosamina

ICH – International Conference on Harmonization

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

KBr – Brometo de potássio

MSC – Fator multiplicativo do sinal

OA - Osteoartrite

PCA – Análise de Componentes Principais

PCR – Regressão em Componentes Principais

PLSR – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

PRESS – Soma dos quadrados dos erros de previsão

RML – Regressão Linear Múltipla

VL – Variáveis Latentes

RESUMO

A glucosamina sulfato e a condroitina sulfato são fármacos utilizados no tratamento da osteoartrite. No mercado brasileiro, esta associação está disponível como medicamento industrializado (Artrolive®) e também como fórmula magistral. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para determinação dessas substâncias em associação. A calibração multivariada associada à espectroscopia no infravermelho constitui uma ferramenta analítica que possibilita esse tipo de determinação. Foram construídos quatro modelos de calibração multivariada no infravermelho com reflectância difusa diferindo quanto à região espectral utilizada. O conjunto de calibração foi constituído de 25 misturas de glucosamina-6-sulfato e condroitina-6-sulfato. O ponto central do planejamento correspondeu às concentrações de 500 mg de glucosamina e 400 mg de condroitina por grama de mistura, proporção esta próxima à presente no medicamento industrializado. As concentrações tiveram uma amplitude de 20% para mais e para menos em relação ao ponto central do planejamento, ou seja, variando de 400 a 600 mg para a glucosamina e de 320 a 480 mg para a condroitina. Os modelos de calibração multivariada desenvolvidos foram testados quanto à capacidade preditiva com cinco misturas cujas concentrações estavam dentro do intervalo de desenvolvimento do modelo, porém diferentes das incluídas no conjunto de calibração (validação externa). O modelo que apresentou a melhor capacidade preditiva na validação externa foi validado quanto aos parâmetros de exatidão, precisão, intervalo e seletividade. O modelo selecionado foi aquele desenvolvido utilizando-se as informações espectrais na região de 6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500 cm^{-1} com cinco variáveis latentes. Os erros médios apresentados por este modelo durante a validação externa foram de 1,37% para a glucosamina sulfato e 1,30% para condroitina sulfato. O método apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros avaliados na validação, o que o torna um método adequado para quantificar simultaneamente glucosamina e condroitina em associação.

Palavras-chave: Glucosamina. Condroitina. Calibração Multivariada. Reflectância Difusa. Validação de método analítico.

ABSTRACT

Glucosamine sulphate and chondroitin sulphate are drugs used in osteoarthritis. In Brazilian market, this association is available as a registered drug (Artrolive®), and also as compounding. However, no method to quantitatively assess simultaneously this association was found in literature. The objective of this study was to develop and validate an analytical method for quantitatively assess this two substances associated. Multivariate calibration joined to infrared spectrophotometry constituted a tool that allowed this analysis. Four models of multivariate calibration in infrared with diffuse reflectance were created, differentiating them in the spectral area. 25 mixtures of glucosamine-6-sulphate and chondroitin-6-sulphate constituted calibrations pool. Central point for planning corresponded to 500 mg glucosamine and 400mg chondroitin for g of the product, which is a proportion close to the one ion the marketed drug. Concentrations ranged 20% in both sides, what means from 400 to 600 mg/g for glucosamine and from 320 to 480 mg/g for chondroitin. Multivariate calibration models were tested about their predictive capability with five mixtures with concentration within the range of the model, although they were different to those included in the calibration pool (external validity). The model that presented a better predictive capability in external validation was also validated regarding its exactitude, precision, range and specificity. Selected model was developed using spectrum information on 6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500 cm^{-1} areas, with five latent variables. Average errors founded with this model during external validation were 1.37% for glucosamine sulphate and 1.30% for chondroitin sulphate. This method presented satisfactory results for assessed variables, what indicates that it is suitable for simultaneously quantify glucosamine and chondroitin associated.

Keywords: Glucosamine. Chondroitin. Multivariate calibration. Diffuse reflectance. Analytical method validation.

1 INTRODUÇÃO

Glucosamina e condroitina são componentes da cartilagem articular. A Glucosamina está envolvida na formação da cartilagem atuando como precursora de unidades de dissacarídeos dos glicosaminoglicanos. A condroitina é um glicosaminoglicano constituinte de proteoglicanos que são importantes componentes da cartilagem articular (HARDINGHAM *et al.*, 1988).

A glucosamina sulfato e a condroitina sulfato são substâncias que vêm sendo utilizadas, isoladamente ou em associação, no tratamento da osteoartrite. A dose diária preconizada para a glucosamina é de 1500 mg e para a condroitina 1200 mg (COIMBRA, *et al.*, 2002)^a. Medicamentos contendo esta associação estão disponíveis tanto como produto industrializado como manipulado. O medicamento industrializado contém 500 mg de glucosamina sulfato e 400 mg de condroitina sulfato na forma farmacêutica cápsula e deve ser utilizado três vezes ao dia. As fórmulas magistrais, em geral, apresentam a mesma concentração do medicamento industrializado, mas também são prescritas em outras concentrações e podem vir associadas a outros fármacos, como diacereína, paracetamol, antiinflamatórios não esteroidais, codeína entre outros.

A produção de medicamentos com associação de dois ou mais fármacos é uma prática freqüente da indústria farmacêutica que pode resultar na otimização do tratamento e na melhora da adesão do paciente à terapia. A determinação do teor de princípio ativo, tanto em medicamentos com fármaco único como nas associações, é fundamental para a garantia da sua eficácia e segurança. Entretanto, essa determinação é mais difícil quando se trata de associações.

A glucosamina e a condroitina são substâncias de ocorrência natural, sendo a glucosamina um aminoaçúcar e a condroitina um glicosaminoglicano cujas unidades de dissacarídeos contêm também um aminoaçúcar, a galactosamina. A condroitina apresenta polidispersidade molecular e ambas as substâncias não apresentam absorção característica no ultravioleta no intervalo de 200 a 700 nm. Estas características são fatores limitantes para a sua quantificação por métodos analíticos convencionais. Não foi encontrado na literatura oficial, durante o desenvolvimento desta pesquisa, um método validado

para a determinação simultânea destas substâncias em associação em formas farmacêuticas.

Nesse contexto, a calibração multivariada apresenta-se como uma ferramenta útil para a quantificação de substâncias, mesmo em misturas complexas, por meio da espectroscopia.

A calibração multivariada é parte da quimiometria, disciplina que agrupa métodos de análise estatística, modelamento matemático e inteligência artificial, com objetivo de analisar dados químicos complexos não analisáveis por outros métodos (MASSART *et al.*, 1988; FERREIRA *et al.*, 1999). É empregada de forma bastante efetiva nos casos em que existe o problema de superposição de sinais analíticos e para determinações simultâneas. Um modelo de calibração multivariada pode ser produzido com base em todas as informações espectrais disponíveis, a fim de estabelecer relação entre os sinais analíticos e a propriedade de interesse (por exemplo, concentração) (COSCIONE, 2001).

A espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa associada à calibração multivariada revela-se um método analítico que possibilita a quantificação simultânea de glucosamina e condroitina e que poderá ser utilizado para o controle de qualidade de formas farmacêuticas que as contêm em associação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método para determinação simultânea de glucosamina sulfato e condroitina sulfato em forma farmacêutica, utilizando-se espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa e calibração multivariada,

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver modelos de calibração multivariada utilizando-se diferentes regiões espectrais.

Avaliar a capacidade preditiva dos modelos por meio de validação externa.

Validar o modelo de melhor desempenho na validação externa segundo os parâmetros de especificidade, intervalo, exatidão e precisão.

Aplicar o método desenvolvido à associação de glucosamina e condroitina em formas farmacêuticas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é uma doença crônica, multifatorial, que leva à incapacidade funcional progressiva (COIMBRA *et al*, 2002)^a e constitui-se na mais importante doença reumatológica (MOREIRA & CARVALHO, 2001). Estima-se que aproximadamente 50% das pessoas com idade acima de 60 anos mostram algum sinal clínico de OA e, freqüentemente, apenas algumas articulações são afetadas (BACHMEIER & BROOKS, 1996).

Um estudo realizado em Curitiba-PR, com pessoas com idade acima de 50 anos, demonstrou que 18,61% das mulheres e 7,75% dos homens apresentavam osteoartrite de mãos (REY *et al*, 2000). Porém, alguns autores já não consideram a OA como um processo inevitável associado ao envelhecimento. Um tratamento adequado pode efetivamente controlar ou reverter a progressão da doença (KELLY, 1998).

A OA é caracterizada por perda progressiva da cartilagem articular e sua etiologia não é completamente conhecida. Múltiplos fatores como hereditariedade, trauma e obesidade podem estar associados a esta doença. Entre as causas envolvidas estão processos mecânicos, celulares e bioquímicos. A interação destes processos leva à mudanças na composição e nas propriedades mecânicas da cartilagem articular (HINTON *et al.*, 2002).

Na OA todos os elementos da articulação são afetados, uma das teorias aceitas é a de que a cartilagem é o primeiro tecido lesionado e, secundariamente, como resposta reativa, seria alteração no osso subcondral (MANKIN, 1992). Exemplos das alterações causadas pela osteoartrite de mãos e joelhos são mostrados nas figuras 1 e 2.

FIGURA 1 - Alterações provocadas nas articulações das mãos pela osteoartrite



FONTE: ABC da saúde, 2005.

FIGURA 2 - Articulação normal do joelho (foto 1) e perda do espaço articular do joelho (foto 2) causada pela osteoartrite



Foto 1

Foto 2

FONTE: WEBMD, 2005.

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado, composto por condrócitos, colágeno, proteoglicanos e água. A composição e a complexa organização estrutural entre o colágeno e os proteoglicanos garantem as propriedades inerentes à cartilagem articular como resistência, elasticidade e compressibilidade. Desse modo, a integridade dos componentes da cartilagem

articular é essencial para garantir a função normal das articulações (VELOSA, TEODORO & YOSHINARI, 2003).

A resposta da cartilagem articular normal à injúria ou degeneração artrósica é vista como uma tentativa de reparação ineficiente. As propriedades bioquímicas e mecânicas do novo tecido diferem da cartilagem original, resultando numa função inadequada ou alterada (HINTON *et al.*, 2002). As principais manifestações clínicas da osteoartrite são dor, rigidez e perda da função articular. Seu diagnóstico é feito por meio de exame físico e pode ser auxiliado por exames radiográficos (BACHMEIER & BROOKS, 1996).

3.1.1 Tratamento

O tratamento divide-se em medidas não farmacológicas e tratamento farmacológico. Entre as medidas não farmacológicas estão exercícios terapêuticos, órteses, uso de palmilhas e cirurgias.

De acordo com o consenso brasileiro para o tratamento da osteoartrite (COIMBRA *et al.*, 2002), a terapia farmacológica inclui os medicamentos relacionados a seguir:

- a) Analgésicos: especialmente paracetamol e dipirona, sendo o paracetamol a primeira escolha para a analgesia, na dose de até 4 mg/dia.
- b) Antiinflamatórios não esteroidais (AINES): diclofenaco, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, piroxicam, celecoxib. São indicados nos casos em que há quadro inflamatório evidente.
- c) Opióides naturais ou sintéticos: principalmente o tramadol, nos casos em que os antiinflamatórios não sejam efetivos ou sejam contraindicados e em que haja dor moderada ou intensa.
- d) Agentes de uso tópico: capsaicina e antiinflamatórios de uso tópico, no tratamento sintomático da dor aguda ou crônica.
- e) Cloroquina: vem sendo utilizada por especialistas em vários serviços brasileiros e tem demonstrado bons resultados. Entretanto, por causa

de seus efeitos colaterais deve haver um acompanhamento mais freqüente do paciente.

- f) Terapia intra-articular: triancinolona, nos casos de quadro inflamatório evidente, e ácido hialurônico, para osteoartrite de joelho graus II e III nas fases aguda e crônica.
- g) Drogas sintomáticas de ação duradoura: possuem ação prolongada na melhora da dor e o efeito terapêutico persiste após sua suspensão. No Brasil estão disponíveis a diacereína, a glucosamina sulfato e a condroitina sulfato.

3.2 GLUCOSAMINA

A glucosamina é uma substância de ocorrência natural (aminoaçúcar), produzida pelo organismo humano dentro de células denominadas condrócitos a partir de moléculas de glicose, na presença de glutamina (um aminoácido essencial) (HÄUSELMANN, 2001). Nos aminoaçúcares, um grupo hidroxila (mais comumente no carbono 2) é substituído por um grupo amino.

A glucosamina está envolvida na formação da cartilagem articular atuando como precursora de unidades de dissacarídeos formadores dos glicosaminoglicanos. A glucosamina estimula os condrócitos a aumentarem a secreção de glicosaminoglicanos e proteoglicanos (CANAPP *et al.*, 1999). Estudos têm demonstrado que doses de 1500 mg/dia induzem alívio da dor associada à osteoartrite e diminuição da perda do espaço articular (ROVATI *et al.*, 1993; REGINSTER *et al.*, 2001;).

De acordo com o Consenso da Sociedade Espanhola de Reumatologia (PANEL DE EXPERTOS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGÍA, 2005), a glucosamina sulfato revela-se eficaz no controle dos sintomas da osteoartrite de joelho. Há destaque para dois estudos (REGINSTER *et al.*, 2001; PAVELKA *et al.*, 2002) de três anos de duração e duas metanálises (TOWHEED, 2002; RICHY *et al.*, 2003) que comprovam a eficácia deste fármaco no tratamento da osteoartrite de joelho, notadamente quanto à perda do espaço articular e à melhora da capacidade funcional e da dor. No entanto, a glucosamina não

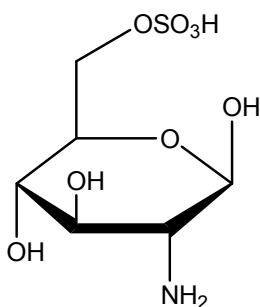
substitui o uso de analgésicos em casos de analgesia de resgate (HUGHES & CARR, 2002).

3.2.1 Aspectos Físico-Químicos da Glucosamina-6-Sulfato

Como matéria-prima para a produção de medicamentos, a glucosamina pode estar na forma de glucosamina-6-sulfato ou glucosamina cloridrato. Neste estudo, optou-se pela utilização da glucosamina-6-sulfato por ser a forma mais comumente utilizada.

A glucosamina-6-sulfato (Fig. 3) caracteriza-se como pó cristalino branco solúvel em água.

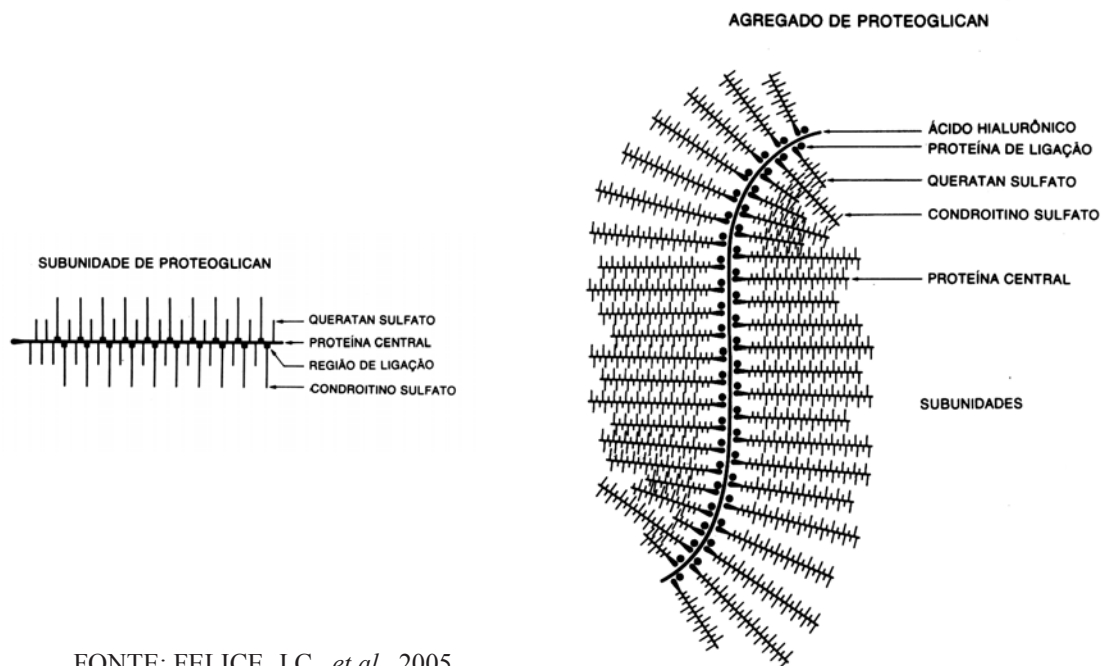
FIGURA 3 - Estrutura química da glucosamina-6-sulfato



3.3 CONDROITINA

A condroitina é o mais abundante glicosaminoglicano presente na cartilagem e é constituinte de proteoglicanos (Fig. 4) que, juntamente com o colágeno, conferem à cartilagem resistência e elasticidade. Além disso, os proteoglicanos colaboram para a manutenção de um grande espaço de hidratação na matriz extracelular (HÄUSELMANN, 2001).

FIGURA 4 - Participação da condroitina na constituição de subunidades de proteoglicanos e o agregado de proteoglicanos presente na cartilagem articular



FONTE: FELICE, J.C., *et al.*, 2005

Os glicosaminoglicanos são uma família de polímeros lineares compostos por unidades de dissacarídeos que se repetem. Um dos monossacarídeos que compõe os dissacarídeos é, sempre, a N-acetilglucosamina ou a N-acetilgalactosamina. Em alguns glicosaminoglicanos, como a condrotina, uma das hidroxilas do açúcar aminado está esterificada com sulfato. A combinação destes grupos sulfatos e dos grupos carboxilatos dos resíduos de ácido urônico confere aos glicosaminoglicanos uma alta densidade de cargas elétricas negativas. A carga elétrica e a estrutura macromolecular colaboram para o seu papel biológico de lubrificar e manter o tecido conjuntivo (LEHNINGER, NELSON & COX, 1995).

Estudo *in vitro* demonstrou a capacidade da condroitina em diminuir a perda de componentes da cartilagem articular (BASSLEER, ROVATI & FRANCHIMONT, 1998). Outro estudo (FERNANDEZ *et al.*, 1997) demonstrou a inibição de enzimas condrolíticas pela condroitina. Em estudo clínico realizado

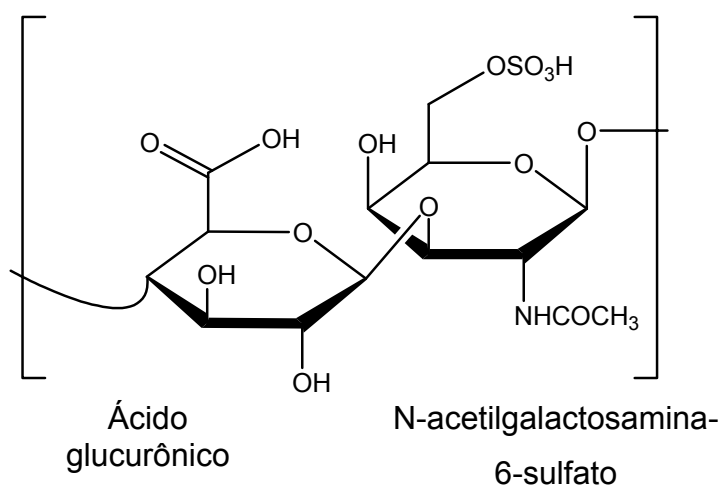
com doses de 2g/dia de condroitina sulfato em pacientes com osteoartrite e idade acima de 50 anos, houve significativa redução do uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) no grupo de pacientes tratados com condroitina (MAZIÉRES *et al.*, 1992). O alívio da dor relacionada à osteoartrite foi percebido após três meses de tratamento e persistiu até um a dois meses após a descontinuação do tratamento (VERBRUGEN, COEMAERE & VEYS, 1997). Além disso, Três metanálises (TOWHEED, 2002; LEEB *et al.*, 2000; McALINDON, *et al.* 2000) demonstraram a eficácia da condroitina sulfato no controle da dor e na melhora funcional dos pacientes afetados pela osteoartrite.

3.3.1 Aspectos Físico-Químicos da Condroitina-6-Sulfato

Como matéria-prima para a produção de medicamentos, a condroitina sulfato pode estar na forma de condroitina-4-sulfato ou condroitina-6-sulfato. Neste estudo, optou-se pela utilização da condroitina-6-sulfato (Fig. 5), por ser esta a forma mais comumente utilizada.

A condroitina-6-sulfato caracteriza-se como pó fino de cor marfim, solúvel em água.

FIGURA 5 - Estrutura química da condroitina-6-sulfato



3.4 ASSOCIAÇÃO DE GLUCOSAMINA E CONDROITINA

Dois estudos clínicos que utilizam a combinação de glucosamina e condroitina para tratamento de osteoartrite de joelho foram realizados nos Estados Unidos. Um deles (DAS & HAMMAND, 2000) demonstrou a efetividade da combinação no tratamento da osteoartrite de joelho, obtendo-se resultados satisfatórios de quatro a seis meses após início do tratamento. O outro (LEFFLER *et al*, 1999) obteve resultado semelhante, mas teve como limitação o número reduzido de pacientes no estudo. Os estudos clínicos sobre o uso da glucosamina e condroitina, isoladas ou em associação, demonstram como vantagem o perfil de segurança apresentado por estas substâncias com relação aos outros fármacos utilizados no tratamento desta patologia.

A combinação de glucosamina sulfato e condroitina sulfato é aprovada como medicamento de prescrição no Brasil e na Europa, enquanto nos Estados Unidos é registrada como suplemento alimentar e não necessita prescrição médica (HÄUSELMANN, 2001).

3.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A região espectral do infravermelho compreende radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} . O espectro de infravermelho é dividido em infravermelho próximo, médio e distante conforme descrito na tabela 1. Os métodos quantitativos no infravermelho diferem dos métodos espectroscópicos no ultravioleta/visível devido à maior complexidade dos espectros, à menor largura das bandas e às limitações instrumentais dos aparelhos de infravermelho (SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2002).

TABELA 1 - Regiões espectrais do infravermelho

Região	Número de onda cm^{-1}
Próximo	12800 a 4000
Médio	4000 a 200
Distante	200 a 10

A espectroscopia no infravermelho, principalmente no infravermelho próximo, tem sido utilizada com frequência pela indústria farmacêutica no controle de qualidade de produtos e monitoração do processo de produção (REICH, 2005; ÖZDEMIR & ÖZTÜRK, 2004). Além disso, a região do infravermelho é adequada para a análise da estrutura química de componentes dos glicosaminoglicanos (FOOT & MULHOLLAND, 2005).

3.5.1 Reflectância Difusa

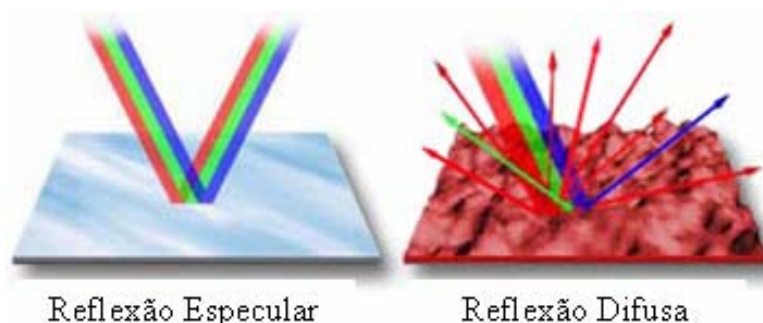
A espectroscopia de reflexão difusa no infravermelho tem se tornado uma técnica instrumental padrão para análises de amostras sólidas pulverizadas (OLINGER & GRIFFITHS, 1993), além de permitir a aquisição de dados convencionais de infravermelho em amostras que não foram alteradas significativamente em relação à sua forma original (SKOOG *et al.*, 2002). Tal técnica apresenta como vantagem análises rápidas de amostras sólidas, sem gasto de tempo com seu preparo, em comparação com as pastilhas de KBr normalmente utilizadas no infravermelho tradicional (KRIVÁCSY & HLAVAY, 1995).

A reflectância difusa no infravermelho próximo tem se tornado a técnica instrumental de escolha para análises de proteína, gordura e açúcares. Os sinais espectrais de compostos orgânicos são geralmente dados por combinações de bandas envolvendo vibrações das ligações C-H, O-H e N-H (OLINGER & GRIFFITHS, 1993).

A técnica que utiliza a reflexão difusa é conhecida como DRIFTS (Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy) (FULLER & GRIFFITHS,

1978). Este tipo de reflexão é observado quando uma luz incide em uma matriz descontínua, penetra na amostra e reflete resultando informações espectrais. O caminho percorrido pela luz no interior da matriz pode ser considerado aleatório devido a múltiplas reflexões. Uma importante diferença entre a transmissão e a reflexão é devida ao diferente caminho ótico da luz. Enquanto na transmissão o caminho ótico é constante para todo comprimento de onda, na reflexão o caminho pode ser variável. Portanto, ao se comparar o espectro obtido por transmissão (pastilhas de KBr) com o obtido por reflexão, as intensidades relativas das bandas serão diferentes (SKOOG *et al.*, 2002). Num experimento de reflexão difusa, será também observada a reflexão especular, que ocorre na interface ar/superfície da matriz. A reflexão especular é de maior intensidade na região onde a amostra apresenta forte absorção, e neste caso, podem ocorrer severas distorções nos espectros obtidos (FERRÃO, 2001). A figura 6 mostra um esquema de reflexão difusa e reflexão especular.

FIGURA 6 - Desenho comparativo das reflexões especular e difusa



FONTE: DAVIDSON, *et al.*, 2005.

Nas amostras sólidas, o tamanho, a forma das partículas, o espaço livre entre elas e o grau de compactação interferem significativamente na resposta espectral (MESSERSCHMIDT, 1999). Dessa forma, a qualidade dos resultados depende de um preparo adequado das amostras.

3.6 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Os avanços nas áreas de quimiometria e computação têm levado ao desenvolvimento de métodos de calibração multivariada para a análise de misturas complexas. Entre os diversos métodos analíticos que possibilitam a análise simultânea de duas ou mais substâncias, a espectroscopia com análise multivariada é freqüentemente indicada como método de referência para diversas substâncias ativas em associação (FERREIRA, *et al.*, 1999). Técnicas que recorrem a modelos multivariados associadas à espectroscopia no infravermelho têm sido utilizadas com sucesso na análise de polissacarídeos (COIMBRA, *et al.*, 2002)^b.

Entre as áreas de maior interesse na quimiometria estão a calibração e a resolução de sistemas multicomponentes (SCARMINIO *et al.*, 1998). A técnica de calibração, análise ou regressão multivariada é empregada de forma bastante efetiva nos casos em que existe o problema de superposição de sinais analíticos e para determinações simultâneas (COSCIONE, 2001). Ao contrário da análise univariada que, em geral, relaciona um único comprimento de onda (de maior intensidade) à concentração do analito de interesse, um modelo de calibração multivariada é produzido com base em todas as informações espectrais disponíveis, a fim de estabelecer relação entre todo o sinal analítico e a propriedade de interesse (concentração) (COSCIONE, 2001).

Os métodos multivariados, de forma geral, podem ser classificados em três categorias: a) sistemas brancos: quando se tem informação espectral de todas as espécies existentes na amostra; b) sistemas cinzas: quando a informação dos espectros das espécies químicas é incompleta ou parcial; c) sistemas pretos: quando não existe nenhuma informação sobre a composição química das amostras. (LIANG, KVALHEIM & MANNE, 1993).

De modo geral, as concentrações dos compostos de interesse numa amostra podem ser determinadas pela construção de curvas de calibração em cada comprimento de onda, a partir de soluções padrão de cada analito, a fim de se estabelecer constantes de proporcionalidade individuais entre concentração e intensidade de absorção. No caso de misturas binárias simples, obtêm-se bons resultados por este método. Porém quando se passa para amostras reais, podem

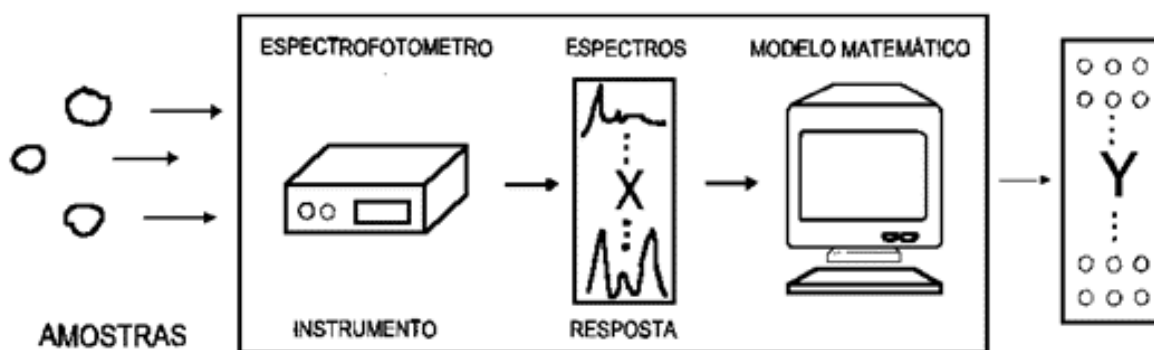
surgir problemas devido a interferências espectrais e desconhecimento da real identidade dos compostos de interesse. Nestas situações, a resolução simultânea das equações já não fornece resultados precisos e por essa razão, foram buscados novos métodos para resolver este tipo de problema (FERREIRA *et al.*, 1999).

Um exemplo é o registro de absorção em mil ou mais comprimentos de onda que é rotineiramente registrada em um único espectro, e que pode ser analisada simultânea e seqüencialmente em uma única amostra (FERREIRA *et al.*, 1999; THOMAS, 1994). A calibração multivariada é empregada de forma bastante efetiva justamente nos casos em que existe o problema de superposição de sinais analíticos e para determinações simultâneas.

No entanto, a aquisição de um grande volume de dados, mesmo que o experimento tenha sido planejado, não significa necessariamente que estes contenham a informação necessária para descrever a propriedade de interesse nas amostras. Assim, o planejamento dos experimentos e a seleção das variáveis também são alvos de estudo da quimiometria e devem ser considerados quando se pretende utilizar métodos mais sofisticados para obter informações acerca dos dados coletados (BEEBE & KOWALSKI, 1987).

Tendo como objetivo a determinação da concentração de um determinado analito em uma amostra, um instrumento de laboratório não produz diretamente as concentrações das amostras. Um espectrofotômetro, por exemplo, registrará a absorvância, que naturalmente dependerá da concentração do analito (FERREIRA *et al.*, 1999). A calibração corresponde ao procedimento realizado a fim de identificar um algoritmo matemático que produza a propriedade de interesse a partir dos resultados registrados pelo instrumento. Neste processo, a análise realizada pelo computador de um conjunto de dados gerados pelo instrumento (por exemplo, absorvância) permitirá a criação de um chamado “modelo de calibração”. Este modelo, uma vez identificado, poderá prever a concentração do analito em amostras de composição desconhecida (FERREIRA *et al.*, 1999). Um esquema do processo de calibração multivariada está representado na figura 7.

FIGURA 7 - Esquema do processo da calibração multivariada

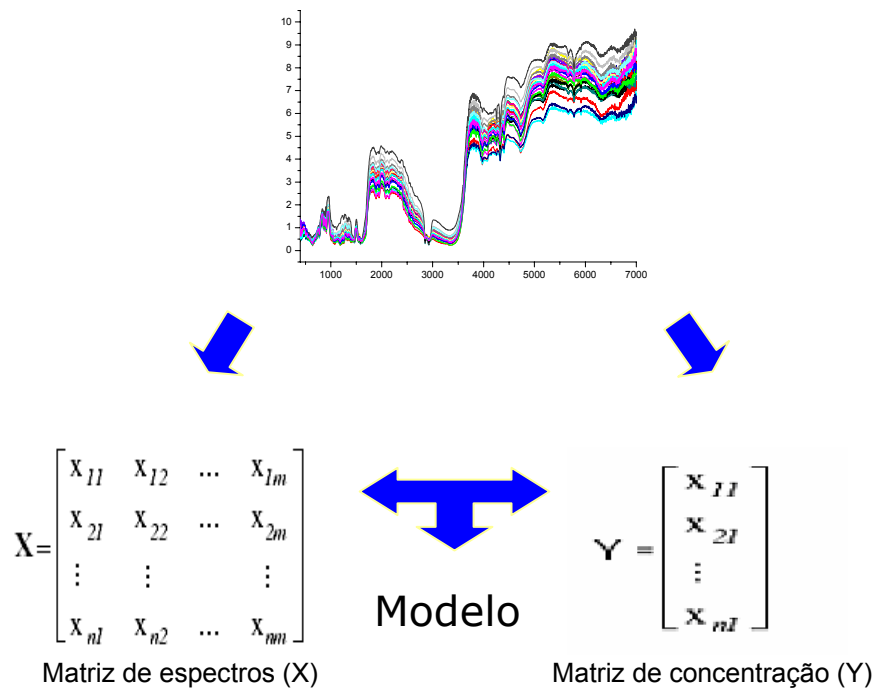


FONTE: FERREIRA *et al.*, 1999.

O objetivo da calibração multivariada consiste, então, em estabelecer uma relação entre os dois blocos de informação química disponível: o das medidas instrumentais (ex. espectros) e o da propriedade calibrada (ex. concentração) (BEEBE & KOWALSKI, 1987). Os espectros, um para cada amostra, são organizados numa matriz X de variáveis independentes, onde cada linha representa uma amostra e cada coluna contém as respostas medidas em cada comprimento de onda. As concentrações correspondentes de cada amostra são organizadas na matriz Y de variáveis dependentes, em que cada linha corresponde a uma amostra. Desta forma, as matrizes X e Y terão sempre o mesmo número de linhas.

Estes dois blocos de informação digitalizados e agrupados na forma de matrizes constituirão o conjunto de calibração e serão analisados computacionalmente para construir o modelo a partir do método de calibração selecionado (MARTENS & NAES, 1989) conforme esquema na figura 8.

FIGURA 8 - Matrizes de espectros e concentrações que constituem o conjunto de calibração.



Após a construção do modelo, ele estará pronto para receber informações de uma nova matriz X (espectros) e prever a propriedade de interesse, a matriz Y de concentrações correspondentes.

Apesar da espectroscopia no infravermelho fornecer um grande número de dados, parte destes não possui informações correlacionadas diretamente com o analito de interesse. Isso pode ocasionar distorções ao modelo, e conseqüentemente a conclusões errôneas nas análises (POPPI & FILHO, 2002). Para minimizar este problema tem sido utilizado métodos de pré-processamento como Savitsky-Golay, para minimizar ruído, e derivada para melhorar a definição de bandas que se encontram sobrepostas em uma mesma região espectral e para correção de linha base (MARTENS, 1996).

Estes tratamentos devem ser realizados apenas na matriz X de espectros, tanto no conjunto de calibração quanto no de previsão.

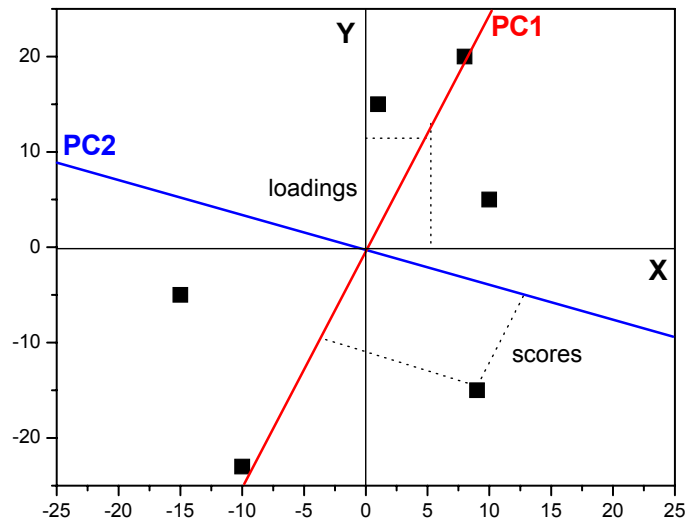
3.6.1 Métodos de Calibração Multivariada

Uma série de técnicas estatísticas tem sido utilizada para o desenvolvimento de metodologias multivariadas e para extrair informação dos espectros com o objetivo de determinar espécies químicas de interesse (SCARMINIO *et al.*, 1998). Os métodos de calibração multivariada utilizados com mais frequência são a regressão em componentes principais (PCR), regressão linear múltipla (RML) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) (BRERETON, 2000). A escolha do método dependerá da informação experimental disponível e do objetivo da análise (SENA, COLLINS & COLLINS, 2001). Os métodos PCR e PLSR são consideravelmente mais eficientes para lidar com ruídos experimentais, colinearidades e não linearidades (FERREIRA, 1999). Todas as variáveis relevantes são incluídas nos modelos que utilizam PCR e PLS, o que significa que a calibração pode ser realizada com eficiência mesmo na presença de interferentes. Estes métodos são robustos, isto é, seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração (GELADI & KOWALSKI, 1986). A base fundamental dos métodos PCR e PLSR para tratamento de dados multivariados é a análise de componentes principais PCA (Principal Component Analysis) (GELADI & KOWALSKI, 1986).

3.6.1.1 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais é um procedimento matemático que transforma os dados espectrais em componentes ortogonais que são combinações lineares dos dados originais (REICH, 2005). Há na figura 9 uma representação esquemática de como isso acontece. O objetivo consiste em representar o conjunto de dados com um número reduzido de novas variáveis, chamadas componentes principais, variáveis latentes ou fatores (THOMAS, 1994; SAVITZKY & GOLLAY, 1994). Desta forma, a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões. A primeira componente principal (PC1) representa a máxima variância associada a todas as combinações lineares e cada componente sucessiva (PC2, PC3, PC4, PCn) representa a variância não representada por PC1, e assim sucessivamente (MARTENS & NAES, 1996).

FIGURA 9 - Esquema representando as componentes principais (PC1 e PC2) e as variáveis originais (x e y).



Scores representam as projeções dos dados no novo conjunto de componentes principais. Scores similares representam amostras similares.

Loadings representa o peso com que cada variável original contribui para a elaboração das novas componentes principais, demonstra que variáveis fazem com que as amostras sejam diferentes.

3.6.1.2 Regressão em componentes principais (PCR)

Este método de calibração multivariada está baseado na análise de componente principal (PCA). Neste caso, a análise de regressão não é feita com base nos valores originais da matriz X, mas com base nos scores obtidos em uma análise de componentes principais. O que se processa é a decomposição da matriz X, produzindo-se uma matriz de scores T, utilizada na determinação dos coeficientes de regressão (b). A equação utilizada na determinação dos valores de y pode ser representada por:

$$Y = Tb + E$$

em que **E** corresponde ao erro residual e **Y** as concentrações de interesse.

O método PCR utiliza, portanto, unicamente as respostas instrumentais para a construção das componentes principais, sem levar em consideração informações provenientes das concentrações. Em decorrência disso, este método pode não ser adequado nos casos em que o analito de interesse tenha um sinal muito fraco (FERREIRA *et al.*, 1999).

3.6.1.3 Regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR)

Herman Wold (1978) desenvolveu a técnica de regressão por mínimos quadrados parciais, que foi utilizada inicialmente na região do infravermelho próximo. Este método também é baseado em decomposição da matriz em componentes principais, mas, diferentemente do PCR, utiliza as informações da matriz **Y** de concentrações na obtenção das componentes principais que, neste caso são chamadas variáveis latentes (FERREIRA *et al.*, 1999). As variáveis latentes representam a máxima variância das variáveis originais que melhor se correlacionam com os valores de concentração (BAXTER & ÖHMAN, 1990; MADAN, DWIVEDI & SINGH, 2005).

A calibração multivariada, utilizando regressão por mínimos quadrados parciais, tem sido o método de calibração multivariada mais utilizado (MARTENS & NAES, 1989), e corresponde a uma importante ferramenta para a química analítica, de interessante potencial de aplicação em muitos problemas de análise farmacêutica (ARANCIBIA *et al.*, 2000; MEDINA *et al.*, 1999). Neste contexto, destacam-se alguns trabalhos recentes que abordam a determinação de fármacos por espectroscopia e análise multivariada (MARKOPOULOU, MALLIOU & KOUNDOURELLIS, 2005; DOU, *et al.*, 2005). Em geral, este recurso permite a determinação de um componente de interesse em matrizes complexas ou a análise de multi-componentes em sistemas mais simples.

A base do método dos mínimos quadrados parciais (PLS) está na decomposição de uma matriz de dados **X**, em termos da soma de várias matrizes **M_i**, que não podem mais ser expandidas, mais uma matriz de erros (que corresponde à parte não modelada de **X**). As matrizes **M_i** constituem os chamados

componentes principais, e são formadas pelo produto de dois vetores, **t** (os *scores*) e **p** (os *loadings*) (ABDI, 2003).

$$\begin{aligned}\mathbf{X} &= \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \dots + \mathbf{M}_a + \mathbf{E} \quad \text{ou,} \\ \mathbf{X} &= \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1 + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2 + \dots + \mathbf{t}_a\mathbf{p}_a + \mathbf{E} \quad \text{ou,} \\ \mathbf{X} &= \mathbf{TP}' + \mathbf{E}\end{aligned}$$

A dimensionalidade do espaço original é igual ao número de colunas em **X**, ou seja, o número de variáveis originais. No novo modelo, a dimensionalidade é descrita pelo número de matrizes **M_i** necessárias para descrever **X**. Assim, se for possível descrever uma matriz **X** que tenha muitas variáveis por um número pequeno dessas matrizes **M_i**, haverá um decréscimo na dimensionalidade, sem perda de informação.

No PLS, tanto a matriz das variáveis independentes **X**, como a das variáveis dependentes **Y**, são representadas pelos *scores* e *loadings*:

$$\begin{aligned}\mathbf{X} &= \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \\ \mathbf{Y} &= \mathbf{UQ}' + \mathbf{F}\end{aligned}$$

Uma relação entre as duas matrizes de dados **X** e **Y** pode ser construída, correlacionando-se os *scores* de cada bloco, por meio da utilização de um modelo linear:

$$\begin{aligned}\mathbf{u}_a &= \mathbf{b}_a\mathbf{t}_a \quad \text{ou,} \\ \mathbf{U} &= \mathbf{bT}\end{aligned}$$

3.6.2 Validação do Modelo de Calibração

A etapa seguinte à construção do modelo é a avaliação de sua capacidade preditiva. Esta avaliação consiste em testar o modelo prevendo-se concentrações

de amostras que, de preferência, não tenham sido incluídas no conjunto de calibração (COSCIONE, 2001).

Há duas formas para a realização da validação do modelo. A primeira é a validação interna, em que amostras que fizeram parte do conjunto de calibração são utilizadas na previsão. A segunda é a validação externa, em que as amostras para previsão não fazem parte do conjunto de calibração. (FERREIRA *et al.*, 1999).

3.7 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NA ANÁLISE DE FÁRMACOS

Em revisão realizada em março de 2005 nas bases de dados Medline e Science Direct foram analisados os resumos de 62 trabalhos publicados que utilizaram calibração multivariada na análise de fármacos. Foram coletadas informações como ano de publicação, primeiro autor, revista em que foi publicado e os fármacos pesquisados. Tais informações são descritas no quadro 1.

QUADRO 1 - Artigos sobre uso da calibração multivariada publicados em revistas indexadas às bases de dados Medline e Science Direct.

Ano	1° Autor	Revista	Fármaco	Método
2005	Markopoulou, C.K.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Imipramina amitriptilina, perfenazina	Espectroscopia Derivada e Calibração Multivariada
2005	Hemmateenejad, B.	Analytica Chimica Acta	Fenotiazina	Calibração Multivariada
2005	Dou, Y.	Analytica Chimica Acta	Paracetamol e Difenidramina	DRIFTS e calibração multivariada
2005	Moreira, A.B.	Talanta	Ácido acetilsalicílico e cafeína	Fluorimetria, calibração multivariada
2005	Jahanbakhsh, G.	Analytica Chimica Acta	Lorazepam	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2004	Palabiyik, I.M.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Pseudoefedrina e ibuprofeno	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada

Ano	1° Autor	Revista	Fármaco	Método
2004	Luis, M.L.	Talanta	Furosemida e trianterene	Fluorimetria e calibração multivariada
2004	Blanco, M.	Analytica Chimica Acta	Azitromicina	Espectroscopia infravermelho calibração multivariada
2004	Sena, M.M.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Ácido acetilsalicílico, paracetamol e cafeína	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada.
2004	Escandar, G.M.	Analytica Chimica Acta	Carbamazepina	Fluorimetria e calibração multivariada
2004	Pistonesi, M.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Levodopa e benserazida	Espectroscopia cinética e calibração multivariada (PLSR)
2004	Dinc, E.	Die Pharmazie	Paracetamol, ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico	Espectroscopia e calibração multivariada

Ano	1° Autor	Revista	Fármaco	Método
2004	Markopoulou, C.K.	Fármaco	Trimetoprima e sulfametoxazol, sulfametazina e sulfafurazol	Espectroscopia derivada e calibração multivariada (PLSR)
2004	Ozdemir, D.	Chemical & pharmaceutical bulletin	Tiamina e piridoxina	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2004	Braga, J.W.	Journal of pharmaceutical sciences	Carbamazepina	DRIFTS e calibração multivariada (PLSR)
2004	Sena, M.M.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Diclofenaco e vitaminas B	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2003	Dinç, E.	Die Pharmazie	Hidroclorotiazida e espironolactona	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2003	Ragno, G.	Talanta	Dihidropiridinas	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2003	Hernández, S.R.	Talanta	Vitaminas B6 e B12	Voltametria e calibração multivariada.

Ano	1° Autor	Revista	Fármaco	Método
2003	Herget, L.A.	Talanta	Ibuprofeno	Fluorimetria e calibração multivariada
2003	Gallego, J.M.L.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Prednisolona, sulfacetamida e fenilefrena	Cromatografia, Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2003	Markopoulou, C.K.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Lovastatina combinada com três antioxidantes	Espectroscopia derivada e calibração multivariada (PLSR)
2003	Wiberg, K.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Solução de lidocaína	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2003	Andrade, S.R.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Mebendazol, cambedazol e tiabendazol	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2003	Dinc, E.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Cafeína, paracetamol e metamizol	Espectroscopia e calibração multivariada
2003	Ustundag, O.	Die Pharmazie	Captopril e hidroclorotiazida	Espectroscopia e calibração multivariada

Ano	1º Autor	Revista	Fármaco	Método
2003	Câmara, M.S.	Analytical and bioanalytical chemistry	Dextropropoxifeno e dipirona	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2003	Nepote, A.J.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Vitamina B6, Vitamina B12 e dexametasona	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2003	Pasamontes, A.	Analytica Chimica Acta	Amoxicilina	Espectroscopia e calibração multivariada
2002	Gallego, J.M.L.	Analytica Chimica Acta	Hidrocortisona, nistatina e oxitetraciclina	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2002	Goicoechea, H.C.	Analytical and bioanalytical chemistry	Clorfeniramina, nafazolina e dexametasona	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2002	Rager, I.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Constituintes da erva de São João	Espectroscopia UV-vis, infravermelho e calibração multivariada
2002	Peña	Talanta	Amoxicilina e ácido clavulânico	Fluorimetria e calibração multivariada

Ano	1º Autor	Revista	Fármaco	Método
2001	Luis, M.L.	Talanta	Dihidralazina, hidroclorotiazida e reserpina	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2001	Ferraro, M.C.F.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Amilorida e hidroclorotiazida	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2001	Ferraro, M.C.F.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Furosemida e amilorida	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2001	Kargosha, K.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Triamterene e hidroclorotiazida	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2001	Ni, Y.	Analytica Chimica Acta	Clorpromazina e prometazina	Voltametria e calibração multivariada
2001	Mansilla, A.E.	Analytica Chimica Acta	Rifampicina, pirazinamida e isoniazida	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2001	Nepote, A.J.	Analytica Chimica Acta	Oxatomide, fenilefrina, paracetamol	Fluorimetria e calibração multivariada

Ano	1º Autor	Revista	Fármaco	Método
2001	Wiberg, K	The Analyst	Lidocaína em solução	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2001	Goicoechea, H.C.	The Analyst	Fenilefrina, difenidramina e nafazolina	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2001	Gallego, J.M.L.	Analytica Chimica Acta	Dexametasona, polimixina B e trimetoprima	Espectroscopia e calibração multivariada
2000	Boeris, M.S.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Fenobarbital, fenitoína e metilfenobarbital	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
2000	Vallvey, L.F.C	Talanta	Ácidos flufenâmico, mefenâmico e meclofenâmico	Fluorimetria e calibração multivariada
2000	Martos, N.R.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Ácido acetilsalicílico, codeína e piridoxina	Fluorimetria e calibração multivariada
2000	Matos, R.C.	The Analyst	Ácido ascórbico, dopamina, epinefrina e dipirona	Potenciometria e calibração multivariada

Ano	1° Autor	Revista	Fármaco	Método
2000	Svensson, O	European journal of pharmaceutical sciences	Metoprolol	Espectroscopia Raman e calibração multivariada
2000	Sena, M.M.	Analytica Chimica Acta	Ácido acetilsalicílico e ácido ascórbico	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
1999	Eustaquio, A.	Analytica Chimica Acta	Paracetamol	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
1999	Goicoechea, H.C.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Rifampicina, isoniazida e pirazinamida	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
1999	Gratteri, P.	The Analyst	Metronidazol e pefloxacin	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
1999	Kirschi, J.D.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Cimetidina	Espectroscopia infravermelho próximo e calibração multivariada
1999	Luis, M.L.	Journal of AOAC International	Clortalidona e espironolactona	Espectroscopia e calibração multivariada

Ano	1º Autor	Revista	Fármaco	Método
1999	Navalón, A.	Talanta	Naproxeno, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico	Fluorimetria e calibração multivariada
1998	Fraga, J.M.G.	Talanta	Captopril	Polarimetria e calibração multivariada
1998	Goicoechea, H.C.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Fenobarbital e fenitoína	Espectroscopia UV-vis e calibração multivariada
1997	Arcos, M.J.	Analytica Chimica Acta	Indometacina e acemethacin	Espectroscopia e calibração multivariada
1997	Blasco, F.	Analytica Chimica Acta	Metionina e cisteína	Espectroscopia e calibração multivariada
1996	Bautista, R.D.	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	Diazepam e piridoxina	Espectroscopia e calibração multivariada
1995	Cabanillas, A.G.	Analytica Chimica Acta	Furazolidona e furaltadona	Potenciometria e calibração multivariada

Ano	1° Autor	Revista	Fármaco	Método
1992	Bozdoan, A.	Talanta	Acetaminofen e cafeína	Espectroscopia e calibração multivariada

O processo de calibração multivariada tem sido bastante utilizado em análises farmacêuticas, principalmente para amostras compostas por múltiplos componentes ou interferentes (CORRER, *et al*, 2005), partindo-se de dados instrumentais de baixa seletividade (MILLER, 1995). Entretanto, a aceitação e a implementação deste método têm sofrido restrições quanto à ausência de validação de acordo com os critérios dos órgãos de fiscalização nacionais e internacionais, como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e ICH (International Conference on Harmonisation's) (BRAGA & POPPI, 2004). A maioria dos trabalhos publicados que utilizam métodos de calibração multivariada na análise de fármacos, não apresentam a sua validação de acordo com estes órgãos.

3.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al.*, 2004).

Órgãos nacionais e internacionais têm estabelecido diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os resultados de uma análise são confiáveis. No entanto, não é possível estabelecer um sistema universal de validação, devido à grande variedade de substâncias, métodos equipamentos e suas complexidades. Assim, torna-se importante um bom planejamento em que sejam avaliados os requerimentos legais e o método analítico escolhido.

Os métodos analíticos podem ser classificados de acordo com a sua finalidade em (USP, 1999):

- Categoria I: Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas;
- Categoria II: Testes quantitativos ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas;

- Categoria III: Testes de desempenho (Ex: dissolução, liberação do ativo);
- Categoria IV: Testes de identificação.

De modo geral, os parâmetros a serem analisados em um método são especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade e exatidão. Porém, para cada categoria exige um determinado conjunto de testes, conforme relacionados no quadro 2 (ANVISA, 2003).

QUADRO 2 - Ensaio necessários para a validação de métodos analíticos de acordo com a sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão (repetibilidade)	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não
* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico;					
** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.					

FONTE: ANVISA, 2003.

3.8.1 Especificidade e Seletividade

Entende-se por especificidade a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003). Isso corresponde à capacidade de um método de não apresentar resultados falso-positivos, quando da identificação de uma substância, por exemplo.

De acordo com LEITE (2002), os procedimentos para demonstrar a especificidade dependerão do objetivo do procedimento analítico, e devem ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método.

Para análises quantitativas (teor) e análises de impurezas, este parâmetro pode ser avaliado pela incorporação à matéria-prima ou ao produto acabado, sob exame de níveis apropriados de impureza ou excipientes, demonstrando-se que o resultado não é afetado pela presença destes compostos. Outra maneira é comparar os resultados do teste com os de um segundo método validado e bem caracterizado (ANVISA, 2003).

Os termos seletividade e especificidade são muitas vezes utilizados indistintamente ou com interpretações diversas, mas, de acordo com o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) (2003), seletividade e especificidade não são sinônimos. Um método específico é aquele capaz de determinar apenas um analito presente na matriz, e seletivo é aquele capaz de determinar e distinguir cada um dos vários analitos presentes na matriz.

3.8.2 Intervalo

Para qualquer método quantitativo, existe um intervalo de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (ANVISA, 2003). A idéia é de que o método deve apresentar linearidade, exatidão e precisão quando as quantidades do analito encontrem-se dentro de um determinado intervalo. Conforme o tipo de ensaio, diferentes intervalos podem ser especificados (ANVISA, 2003):

- Para a determinação quantitativa de matéria-prima ou produtos acabados: normalmente de 80% a 120% da concentração teórica do teste;
- Para a determinação de impurezas: do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado;
- Para ensaio de uniformidade de conteúdo: de 70% a 130% da concentração teórica do teste;
- Para ensaios de dissolução: $\pm 20\%$ sobre o valor especificado no intervalo.

3.8.3 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (INMETRO, 2003).

A linearidade pode ser avaliada pela inspeção visual de gráfico plotado pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes, conforme intervalo especificado pelo tipo de ensaio. Se houver relação linear aparente, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, como a regressão linear pelo método de mínimos quadrados. As grandezas observadas podem ser o coeficiente de correlação, o coeficiente de determinação, a intersecção com o eixo Y, o coeficiente angular e o desvio padrão relativo (ANVISA, 2003; ICH, 1996). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 de acordo com a ANVISA (2003) e 0,90 de acordo com o INMETRO (2003).

3.8.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados por meio dele obtidos em relação ao valor verdadeiro. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (INMETRO, 2003).

Várias metodologias de avaliação da exatidão estão disponíveis (ANVISA, 2003):

- Matérias-primas (fármacos). Pela aplicação da metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida.
- Produtos acabados (forma farmacêutica). Pela análise de uma amostra em que quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, na indisponibilidade de todos os componentes do medicamento, a análise pelo método de adição de padrão, em que se adiciona quantidade conhecida do analito (padrão de referência) ao medicamento.

A exatidão é calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica (real)}} \times 100$$

A exatidão deve ser determinada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando-se o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada (ANVISA, 2003).

3.8.5 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). A precisão pode ser considerada em três níveis (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003; ICH, 1996):

- Repetibilidade (Precisão intra-corrida): grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob condições de repetibilidade – mesmo procedimento de medição

realizado pelo mesmo analista e instrumentação, dentro de um curto período de tempo. A repetibilidade pode ser verificada pela avaliação de um mínimo de 9 (nove) determinações de um mínimo de 3 (três) níveis de concentrações, de acordo com o intervalo especificado (ex. 3 concentrações/3 replicatas cada) ou num mínimo de 6 determinações a 100% da concentração teste.

- Precisão Intermediária (Precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados de um mesmo laboratório.
- Reprodutibilidade (Precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de métodos executados por um único laboratório, é considerada um parâmetro importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação a outros laboratórios.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, não devendo ultrapassar 5% de variação. O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) é obtido segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

3.8.6 Robustez

A robustez é a medida da capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ANVISA, 2003). Um método é dito robusto quando se revela praticamente insensível a variações que possam ocorrer quando está sendo executado. Constatando-se a suscetibilidade do método a determinadas variações, estas deverão ser declaradas como precauções e controladas durante a execução do procedimento. O quadro 3 traz os fatores que devem ser considerados na determinação da robustez de um método analítico.

QUADRO 3 - Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.

Preparo das amostras	Estabilidade das soluções analíticas Tempo de extração
Espectrofotometria	Variação do pH da solução Temperatura Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	Variação do pH da fase móvel Variação na composição da fase móvel Diferentes lotes ou fabricantes de colunas Temperatura Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas Temperatura Velocidade do gás de arraste

FONTE: ANVISA, 2003.

3.8.7 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a capacidade de um método em distinguir, com determinado nível de segurança, duas concentrações próximas. A sensibilidade é útil como um parâmetro comparativo entre dois métodos, em que o método de maior sensibilidade apresenta curva padrão com maior inclinação (ICH, 1996).

4. MATERIAL E MÉTODOS

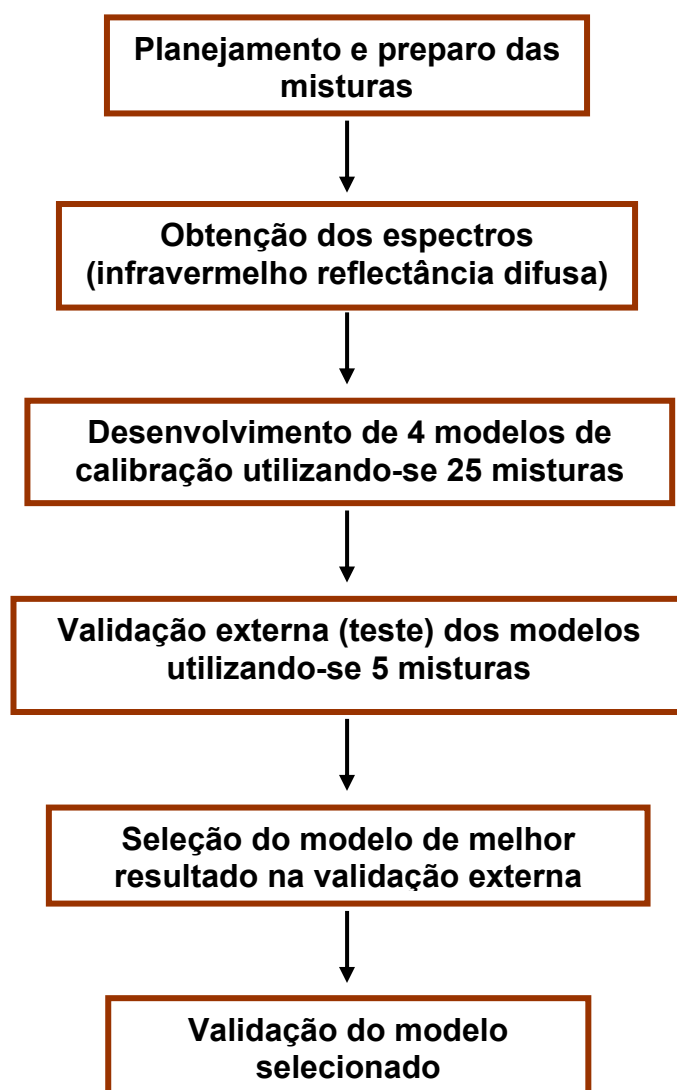
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A pesquisa compreendeu duas etapas distintas. Na primeira houve o desenvolvimento e teste da capacidade preditiva (validação externa) de modelos de calibração multivariada e, na segunda, validação do modelo que apresentou melhor desempenho na validação externa.

Para a primeira etapa da pesquisa, foram desenvolvidos quatro modelos de calibração multivariada a partir de um mesmo conjunto de misturas contendo diferentes concentrações de glucosamina-6-sulfato e condroitina-6-sulfato. Os modelos diferiram quanto à região espectral considerada e foram desenvolvidos com diferentes números de variáveis latentes e testados utilizando-se misturas de glucosamina-6-sulfato e condroitina-6-sulfato que não foram incluídas na construção do modelo.

Na segunda etapa, o modelo de melhor desempenho foi validado de acordo com critérios de seletividade, intervalo, precisão e exatidão. As várias etapas percorridas para o desenvolvimento e validação do método estão esquematizadas no fluxograma da figura 10.

FIGURA 10 - Fluxograma geral de desenvolvimento e validação de método para determinação simultânea de glucosamina sulfato e condroitina sulfato utilizando-se espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa e calibração multivariada.



4.2 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

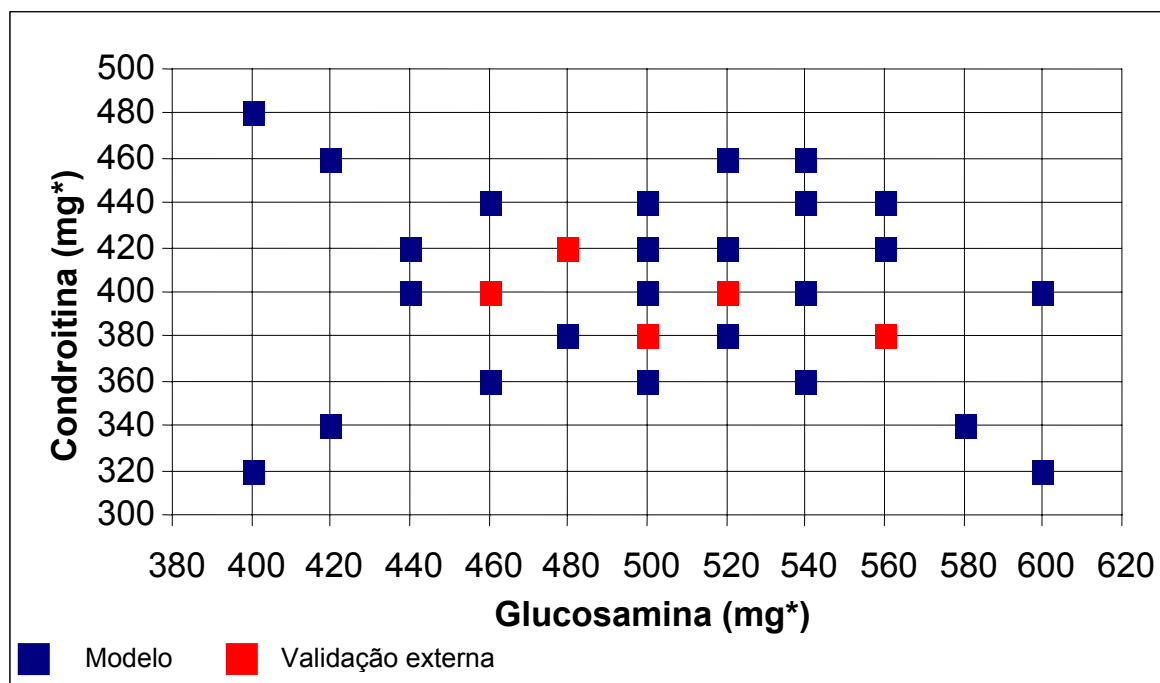
Para o preparo das misturas foram utilizados glucosamina-6-sulfato e condroitina-6-sulfato, ambos padrão Sigma[®]. Os espectros na região do infravermelho com reflectância difusa foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro Excalibur (modelo FTS-4000 Bio-Rad). Para a construção das matrizes de dados foi utilizado o software Origin Pro 6.1[®] e, para a construção dos modelos, o programa PLS-toolbox 1.5, que opera em ambiente Matlab v.4.2.

4.3 PLANEJAMENTO E PREPARO DAS MISTURAS

Para o planejamento das concentrações das misturas considerou-se como ponto central a concentração de 500 mg para a glucosamina-6-sulfato e 400 mg para a condroitina-6-sulfato por grama de mistura. Foram planejadas 30 concentrações diferentes nos intervalos de 400 a 600 mg para a glucosamina-6-sulfato e 320 a 480 mg para a condroitina-6-sulfato por grama de mistura.

Do total de 30 misturas, 25 foram utilizadas para o desenvolvimento dos modelos de calibração e 5 para avaliar a capacidade preditiva dos modelos (validação externa). Na figura 11, encontra-se o planejamento gráfico das 25 misturas para o desenvolvimento dos modelos e das 5 misturas utilizadas para previsão do modelo.

FIGURA 11 - Planejamento gráfico das concentrações das misturas de glucosamina 6-sulfato e condroitina 6-sulfato utilizadas no desenvolvimento e na validação externa dos modelos de calibração multivariada.



* Quantidades por grama de mistura.

As misturas de glucosamina e condroitina foram preparadas utilizando-se estearato de magnésio como diluente para a obtenção das concentrações desejadas. Este diluente foi escolhido por ser o excipiente presente no medicamento industrializado. As misturas foram preparadas em geral utilizando-se sempre a mesma ordem de adição das substâncias e o mesmo procedimento e tempo de trituração e homogeneização. As quantidades de cada uma das substâncias empregadas no preparo das misturas e as concentrações resultantes correspondentes encontram-se nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

TABELA 2 - Conteúdo das 30 misturas utilizadas no desenvolvimento e na validação dos modelos de calibração multivariada

Mistura	Glucosamina-6-sulfato (mg)	Condroitina-6-sulfato (mg)	Estearato de magnésio (mg)
1	200	240	60
2	300	200	0
3	210	230	60
4	230	220	50
5	250	220	30
6	270	220	10
7	280	220	0
8	220	210	70
9	240	210	50
10	250	210	40
11	260	210	30
12	220	200	80
13	230	200	70
14	250	200	50
15	270	200	30
16	240	190	70
17	250	190	60
18	260	190	50
19	230	180	90
20	250	180	70
21	270	180	50
22	210	170	120
23	290	170	40
24	200	160	140
25	300	160	40
26	260	230	10
27	270	230	0
28	280	210	10
29	260	200	40
30	280	190	30

TABELA 3 - Concentrações de glucosamina-6-sulfato, condroitina-6-sulfato e estearato de magnésio nas 30 misturas utilizadas para o desenvolvimento e a validação do modelo de calibração multivariada

Mistura	Glucosamina sulfato (mg)*	Condroitina sulfato (mg)*	Estearato de magnésio (mg)*
1	400	480	120
2	600	400	0
3	420	460	120
4	460	440	100
5	500	440	60
6	540	440	20
7	560	440	0
8	440	420	140
9**	480	420	100
10	500	420	100
11	520	420	60
12	440	400	160
13**	460	400	140
14	500	400	100
15	540	400	60
16	480	380	140
17**	500	380	120
18	520	380	100
19	460	360	180
20	500	360	140
21	540	360	100
22	420	340	240
23	580	340	80
24	400	320	280
25	600	320	80
26	520	460	20
27	540	460	0
28	560	420	20
29**	520	400	80
30**	560	380	60

* Quantidade das substâncias por grama de mistura.

**Misturas utilizadas na validação externa do modelo

4.4 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS

Os espectros no infravermelho com reflectância difusa de todas as misturas, das substâncias puras e do excipiente estearato de magnésio foram obtidos a partir de leitura na faixa espectral de 7000 a 400 cm^{-1} , utilizando-se resolução 4 e 128 scans.

4.5 DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Os modelos desenvolvidos diferiram quanto à região espectral considerada, conforme o que apresenta o quadro 4. Cada um dos modelos foi construído considerando-se, ainda, diferentes números de variáveis latentes.

QUADRO 4 - Regiões espectrais consideradas na construção dos modelos de calibração

Modelos	Intervalo de números de onda considerado (cm^{-1})	Região espectral e quantidade de número de ondas correspondentes ¹
Modelo 1	4000 a 400	Infravermelho médio (1867 números de onda)
Modelo 2	7000 a 4000	Infravermelho próximo (1557 números de onda)
Modelo 3	7000 a 400	Região espectral total (3424 números de onda)
Modelo 4	6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500	Infravermelho próximo (910 números de onda) e infravermelho médio (156 números de onda)

O critério para a escolha das regiões espectrais baseou-se na divisão clássica em infravermelho médio (modelo 1) e próximo (modelo 2), no uso de toda a informação espectral disponível (modelo 3) e em regiões segmentadas do

¹ A obtenção dos espectros foi realizada com intervalo de aproximadamente 1,93 números de onda.

espectro (modelo 4). A escolha da região espectral para a construção do modelo 4 foi baseada na comparação do espectro das substâncias puras com o espectro das misturas. As regiões escolhidas, nos espectros das misturas, foram aquelas em que houve boa reprodução das bandas dos espectros das substâncias puras.

As informações espectrais obtidas das vinte e cinco misturas planejadas para o desenvolvimento dos modelos foram transferidas para o software Origin Pro 6.1[®] para a construção da matriz X de informações espectrais. A matriz Y foi construída com as informações de concentrações correspondentes. As matrizes X e Y foram exportadas para o programa PLS-toolbox 1.5 em ambiente Matlab v.4.2, onde foram desenvolvidos os modelos.

Durante o desenvolvimento dos modelos, os dados das matrizes X e Y foram centrados na média, que consiste em subtrair o valor de cada elemento da coluna pelo valor médio dos elementos dessa coluna, resultando em uma matriz onde as colunas têm médias iguais a zero.

O método de calibração empregado foi o de regressão em mínimos quadrados parciais (PLSR). O número de variáveis latentes em função do PRESS (soma dos quadrados do erro de previsão) foi obtido utilizando-se o sistema de validação cruzada “leave-one-out”, que consiste em deixar de fora uma das amostras do conjunto de calibração por vez, prevendo a concentração desta amostra com o modelo então construído sem ela. Isso é repetido para cada uma das amostras até que cada amostra tenha sido excluída uma vez do conjunto de calibração. O erro de previsão é obtido comparando-se a concentração prevista de cada amostra com seu valor verdadeiro indicado na matriz Y. A somatória dos quadrados do erro de previsão PRESS é definida como:

$$\text{PRESS} = \sum (y' - y)^2$$

onde y' é o valor conhecido e y é o valor calculado.

A etapa seguinte na construção do modelo foi a verificação de anomalias (outliers) no conjunto de amostras. Essas anomalias representam, em geral, dados irrelevantes, erros grosseiros quando comparados com a maioria dos dados. Para a detecção de anomalias foram utilizadas as grandezas “leverage”, que mede a influência de uma amostra no conjunto de calibração e resíduo de

Student, o qual indica se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

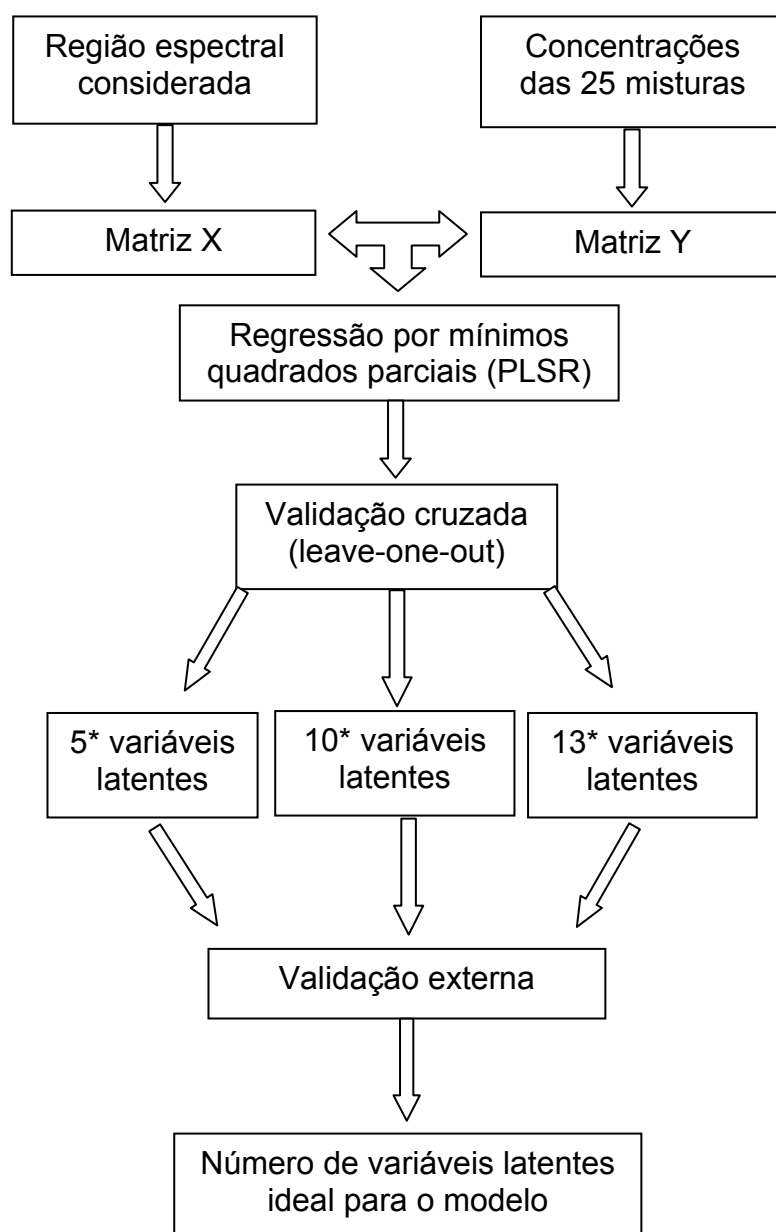
O valor máximo permitido para “leverage” é dado por $3 \text{ VL}/n$, em que **VL** corresponde ao número de variáveis latentes e **n** ao número de amostras utilizadas. Com relação aos resíduos de Student, valores além de $\pm 2,5$ demonstram possível anomalia da amostra.

4.5.1 Validação Externa

Para determinar o número ideal de variáveis latentes para cada um dos modelos e selecionar o modelo de melhor capacidade preditiva foi utilizado o método de validação externa que consiste em testar o modelo com amostras não utilizadas no conjunto de calibração. Neste caso, foram utilizadas cinco misturas para realizar a previsão do modelo (Fig. 12). Estas misturas foram escolhidas por estarem próximas da concentração do ponto central, aproximando-se, assim, das concentrações de amostras reais.

Um resumo esquemático do desenvolvimento e da validação externa de cada um dos modelos está representado na figura 12.

FIGURA 12 - Fluxograma do desenvolvimento, validação externa dos modelos de calibração e seleção do número ideal de variáveis latentes



* Estes números de variáveis latentes foram escolhidos apenas como exemplo. Diferentes números podem ser usados e o número total de variáveis latentes possíveis para o desenvolvimento de um modelo corresponde ao número de amostras utilizadas, que, neste caso, é 25.

4.6 PRÉ-TRATAMENTO DOS DADOS

Os pré-tratamentos foram aplicados aos dados espectrais que originaram o modelo de melhor desempenho na validação externa, com o objetivo de diminuir regiões de ruídos e melhorar a relação sinal/ruído. Os pré-tratamentos realizados foram derivação com alisamento e correção do fator multiplicativo do sinal (MSC). Os dados espectrais obtidos após pré-processamento foram utilizados para o desenvolvimento de modelos de calibração da mesma forma como foram construídos os demais modelos. Os resultados dos modelos que utilizaram o pré-processamento dos espectros foram comparados aos resultados obtidos sem nenhum pré-processamento.

4.6.1 Derivação e Alisamento dos Espectros

O procedimento de alisamento foi feito para minimizar os ruídos espectrais. Para tanto, foi utilizado o algoritmo de Savitzky-Golay. A característica do procedimento é a redução dos ruídos por aproximadamente a raiz quadrada do número de pontos usados na convolução. O número de pontos ideal para a convolução é aquele que acarretará a menor distorção em relação aos dados originais. Analisando-se os espectros sem alisamento e os mesmos espectros alisados com diferentes números de pontos, foi escolhido o valor de 8 pontos para a convolução. Este foi o número que resultou num espectro com regiões de ruído amenizadas sem que tenha havido, no entanto, perda de bandas características. Os espectros foram derivados em 1º ordem e alisados no mesmo programa de desenvolvimento dos modelos (PLS Toolbox).

4.6.2 Correção do Fator Multiplicativo do Sinal (MSC)

Este tipo de pré-tratamento corrige as variações do espalhamento de luz para as medidas de reflectância difusa. Esta correção assume que o coeficiente de espalhamento é o mesmo para todos os comprimentos de onda. É baseada em um modelo linear, conforme a equação:

$$x = a + bx' + e$$

onde “x” representa o espectro da amostra, x’ o espectro da amostra de referência (espectro obtido pela média das amostras), “a” representa as informações químicas em x e “e” são os resíduos (HELLAND, NAES & ISAKSSON, 1995).

4.7 VALIDAÇÃO

O modelo de melhor desempenho na validação externa foi validado quanto aos parâmetros de seletividade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão.

4.7.1 Seletividade

A seletividade foi testada avaliando-se a capacidade do método em determinar os dois analitos separadamente na presença do excipiente. Para tanto, foram utilizadas amostras contendo glucosamina, condroitina e estearato de magnésio em diferentes concentrações (Tabela 4) e foi avaliada a capacidade do método em prever separadamente apenas os analitos de interesse (glucosamina e condroitina) presentes na matriz.

4.7.2 Intervalo

A definição da faixa de trabalho do modelo multivariado deve considerar a concentração mediana do conjunto de calibração, modelando então pontos de concentração ao redor desse valor, atingindo um limite de + 20% e – 20% (ANVISA, 2003), partindo-se do ponto central. No caso das misturas contendo condroitina sulfato e glucosamina sulfato, o ponto central corresponde às concentrações de 500 mg/g de glucosamina e 400 mg/g de condroitina, variando de 400 a 600 mg/g para a glucosamina e de 320 a 480 para a condroitina, o que corresponde a uma variação de + e – 20%.

4.7.3 Precisão

Para avaliação da precisão foram realizados ensaios de repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corridas).

Para a realização destes ensaios foram preparadas quatro misturas com diferentes concentrações de glucosamina-6-sulfato e condroitina-6-sulfato, sendo uma das misturas correspondente ao ponto central do planejamento e as outras três correspondentes a valores limítrofes no intervalo do método. As misturas utilizadas e as concentrações correspondentes são descritas na tabela 4.

TABELA 4 - Misturas utilizadas no ensaio de precisão, exatidão e seletividade

Glucosamina-6-sulfato (mg*)	Condroitina-6-sulfato (mg*)	Mistura Correspondente
400	480	1
500	400	14
400	320	24
600	320	25

* Quantidades por grama de mistura.

Cada uma das misturas foi preparada três vezes e lida em triplicata, o que correspondeu a 9 determinações para cada concentração, resultando num total de 36 determinações. Os resultados de previsão do modelo multivariado para estas misturas foram comparados pela média, desvio padrão e coeficiente de variação. Foram considerados satisfatórios valores de coeficiente de variação inferiores a 5% (ANVISA, 2003).

Para o ensaio de precisão intermediária foram refeitos os procedimentos de repetibilidade em outro dia, por outro analista, no mesmo laboratório e no mesmo equipamento. Os resultados de previsão do modelo multivariado neste ensaio foram analisados pela média, desvio padrão e coeficiente de variação. Da mesma forma foram considerados satisfatórios valores de coeficiente de variação inferiores a 5%.

4.7.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada utilizando-se ensaio de recuperação em que quantidades conhecidas de glucosamina-6-sulfato e condroitina-6-sulfato padrão foram adicionadas ao excipiente estearato de magnésio. As misturas utilizadas para o ensaio de recuperação foram as mesmas empregadas na avaliação da precisão. Os valores foram demonstrados em porcentagem de recuperação que corresponde à seguinte equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Foram considerados satisfatórios valores de 98 a 102% de recuperação (ANVISA, 2003).

4.7.5 Parâmetros não avaliados

Dois parâmetros não puderam ser avaliados para o método desenvolvido.

O primeiro foi a linearidade, tendo em vista que a técnica multivariada não fornece resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse. A análise multivariada não permite correlacionar uma resposta de sinal à concentração do analito como acontece na análise univariada.

O segundo parâmetro não avaliado foi a robustez. De acordo com a ANVISA, 2003, para este tipo de método devem-se avaliar as influências de pH, temperatura e diferentes fabricantes de solvente. Fatores como pH e solventes não são possíveis de serem avaliados já que o método foi desenvolvido com amostras sólidas.

4.8 ANÁLISE DE MEDICAMENTOS

O método selecionado e validado foi utilizado para a quantificação de medicamentos manipulados que continham 500 mg de glucosamina e 400 mg de condroitina por cápsula e do medicamento industrializado Artolive®. Os

medicamentos manipulados foram adquiridos em três farmácias de manipulação de Curitiba-PR.

As amostras dos medicamentos foram preparadas com o diluente estearato de magnésio, de forma que a concentração final fosse 500 mg de glucosamina e 400 mg de condroitina por grama de mistura.

Para tanto, foram utilizadas 20 cápsulas² de cada um dos medicamentos. O conteúdo das 20 cápsulas foi pesado e transferido para um gral de vidro para mistura e homogeneização. Em seguida, o conteúdo correspondente a uma cápsula foi pesado e transferido para outro gral em que as quantidades de estearato de magnésio necessárias para a obtenção da concentração final desejada foram acrescentadas. As quantidades dos medicamentos e de estearato de magnésio utilizadas para o preparo de cada amostra estão descritas na tabela 5.

² Nos medicamentos manipulados, foram utilizadas 40 cápsulas, pois uma dose era equivalente a duas cápsulas.

TABELA 5 - Esquema de diluição das amostras de medicamentos para obtenção da concentração de 500 mg de glucosamina e 400 mg de condroitina por grama de mistura

Medicamentos	Quantidade média do conteúdo por cápsula/dose (mg)	Quantidade de diluente adicionada (mg)	Quantidade final (g)
Artrolive®	937,45	62,55	1,0
Manipulado 1	900,32	99,68	1,0
Manipulado 2	947,37	52,63	1,0
Manipulado 3	927,83	72,17	1,0

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESPECTRO NO INFRAVERMELHO COM REFLECTÂNCIA DIFUSA

Os espectros no infravermelho com reflectância difusa da glucosamina-6-sulfato e da condroitina-6-sulfato apresentam-se nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

FIGURA 13 - Espectro no infravermelho com reflectância difusa da glucosamina-6-sulfato

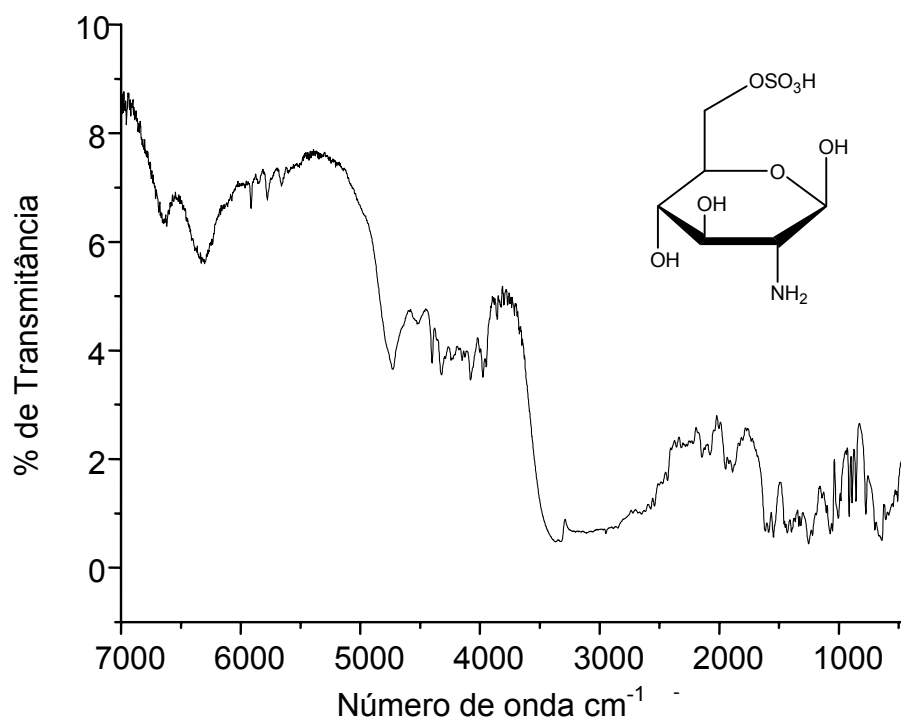
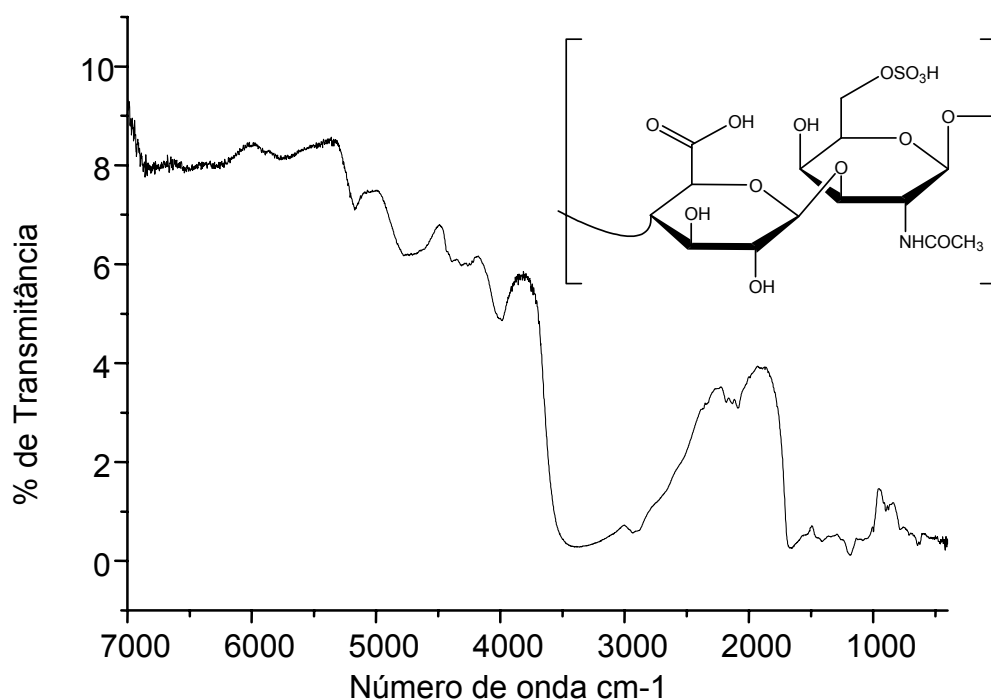


FIGURA 14 - Espectro no infravermelho com reflectância difusa da condroitina-6-sulfato



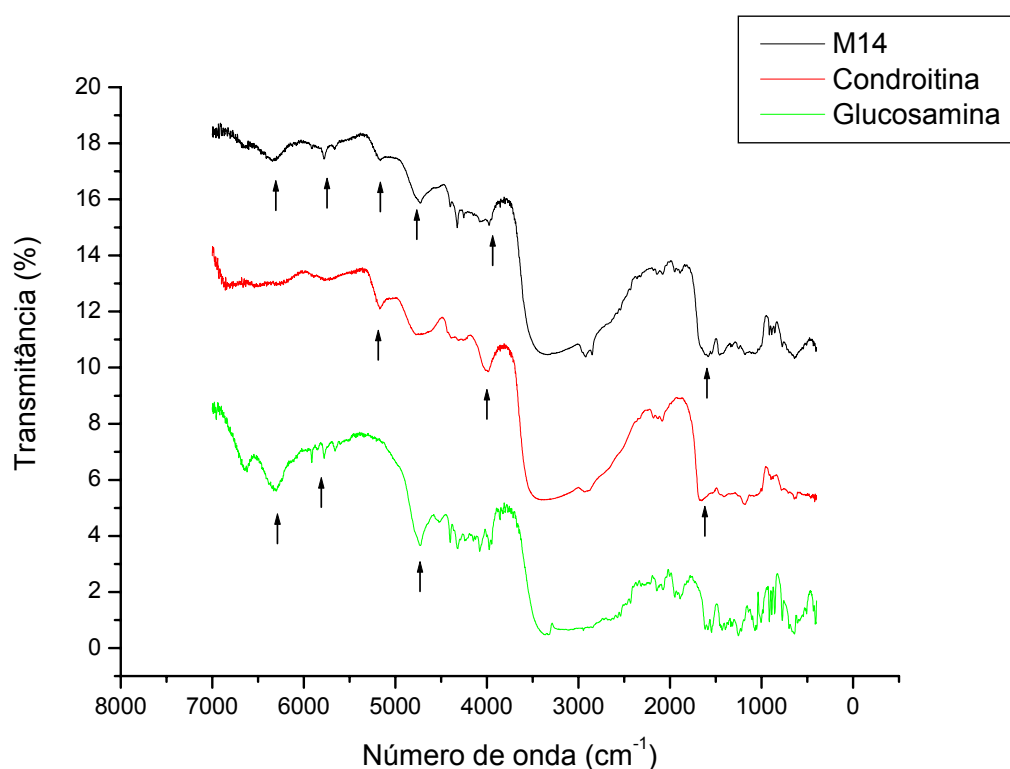
Glucosamina-6-sulfato e condroitina-6-sulfato diferem quanto aos grupos químicos presentes e ao tipo de monossacarídeo. Condroitina-6-sulfato é um glicosaminoglicano constituído de resíduos alternados de ácido urônico e N-acetil-*D*-galactosamina-6-sulfato, sendo que as unidades de dissacarídeo estão unidas umas às outras através de ligação β 1-4 e os resíduos estão unidos uns aos outros através de ligação β 1-3, apresentando, portanto, na sua estrutura grupamento carboxílico, N-acetil e sulfato além de ligações glicosídicas. A glucosamina-6-sulfato é um monossacarídeo que contém um grupo amino e um grupo sulfato.

Essas diferenças na estrutura química são responsáveis pelas diferenças observadas nos espectros das substâncias puras e podem influenciar a seletividade do método.

Para facilitar a observação de tais diferenças, na figura 15 apresentam-se simultaneamente os espectros da glucosamina-6-sulfato, condroitina-6-sulfato e

da mistura 14 (500mg glucosamina-6-sulfato, 400 mg de condroitina-6-sulfato e 100 mg de estearato de magnésio).

FIGURA 15 - Espectros no infravermelho com reflectância difusa da glucosamina-6-sulfato, condroitina-6-sulfato e da mistura 14



Apesar de apresentarem um perfil semelhante, é possível identificar nos espectros da glucosamina-6-sulfato e da condroitina-6-sulfato bandas características e diferentes de cada um dos fármacos (indicadas nas setas). No espectro da mistura 14, que representa a soma dos espectros das substâncias puras, é possível perceber a reprodução destas bandas.

5.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

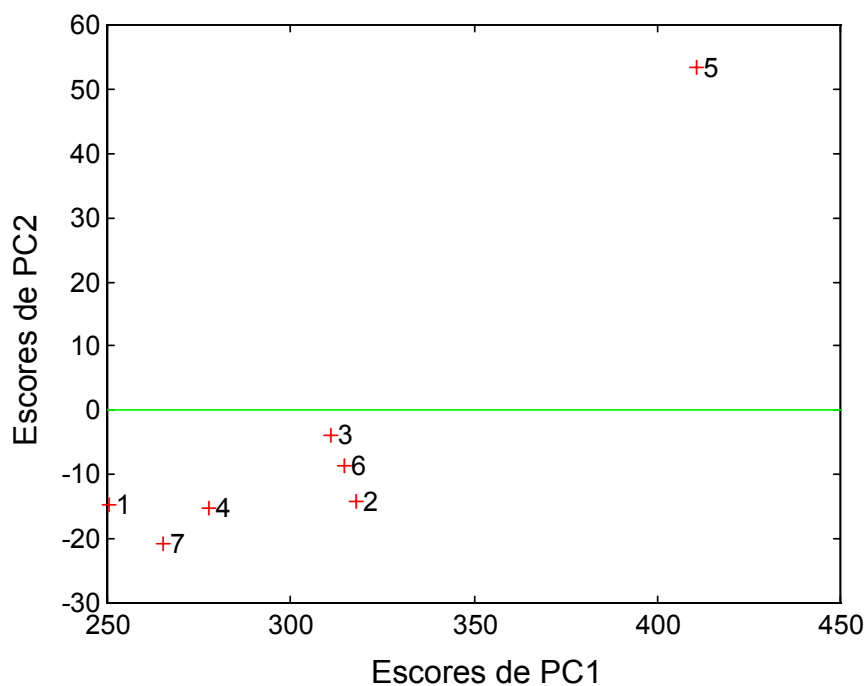
Para demonstrar a capacidade do modelo em distinguir as informações espectrais relacionadas às misturas e substâncias puras das relativas ao excipiente, foi feita a análise de componentes principais (PCA), conforme

demonstrado na figura 16. Para esta análise foram utilizadas as amostras descritas na tabela 6.

TABELA 6 - Amostras utilizadas na análise de componentes principais (PCA).

Amostra	Glucosamina (mg)	Condroitina (mg)	Estearato de magnésio (mg)
1 (mistura 2)	600	400	0
2 (mistura 7)	560	440	0
3 (mistura 14	500	400	100
4 (mistura 27)	540	460	0
5	0	0	1000
6	0	1000	0
7	1000	0	0

FIGURA 16 - Gráfico dos escores de PC1 X PC2 da análise de componentes principais utilizando espectros de glucosamina-6-sulfato, condroitina-6-sulfato, estearato de magnésio e das misturas 2, 7, 14 e 27

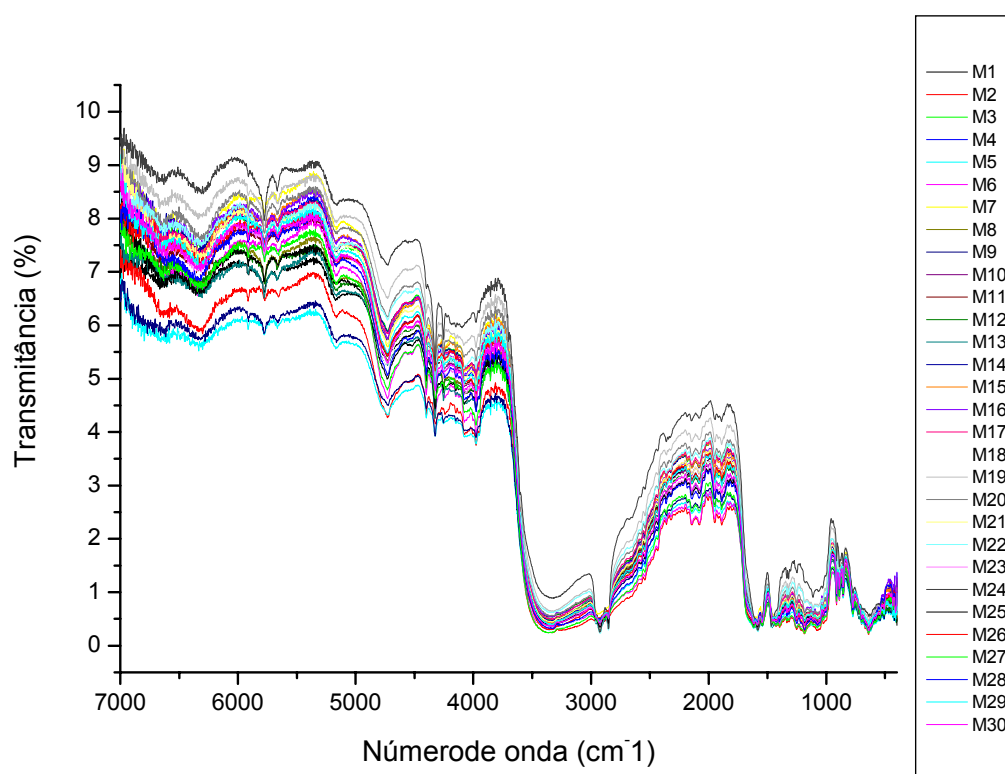


É possível perceber uma nítida diferenciação feita pela componente principal 2 das misturas e substâncias puras com relação ao excipiente. Mesmo a mistura que contém excipiente (amostra 3) é agrupada próximo às outras misturas e substâncias puras. Isto demonstra que o modelo é capaz de determinar glucosamina e condroitina mesmo na presença deste excipiente (estearato de magnésio).

5.3 MODELOS DE CALIBRAÇÃO

Os espectros das 25 misturas utilizados na construção dos modelos de calibração multivariada e das 5 misturas utilizadas na validação externa encontram-se na figura 17.

FIGURA 17 - Espectro no infravermelho com reflectância difusa das 30 misturas utilizadas para o desenvolvimento e a validação do modelo de calibração multivariada.

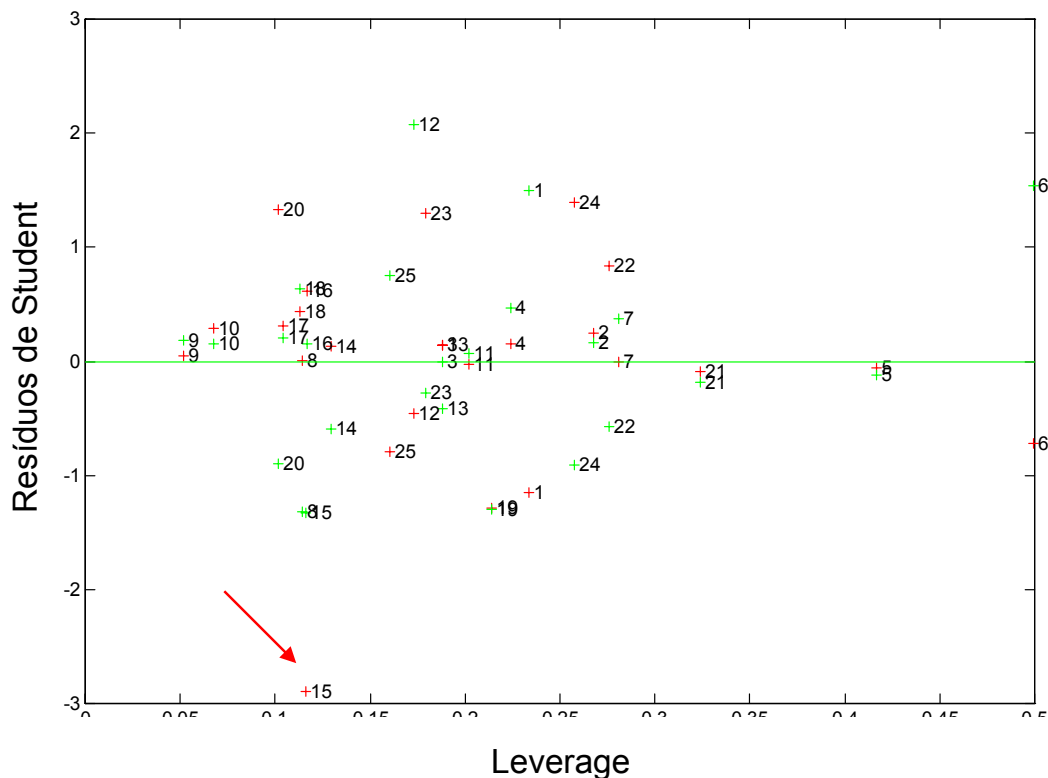


5.3.1 Análise de Anomalias

A identificação de amostras anômalas, que poderiam influenciar negativamente os modelos, foi feita pela análise do gráfico de leverage (influência) e resíduos de student.

Durante a construção dos modelos de calibração, a mistura de número 15 foi identificada como anômala na análise do gráfico de resíduos de student por leverage, como apresentado no exemplo da figura 18.

FIGURA 18 - Análise de anomalias na construção do modelo 1 de calibração multivariada



O gráfico apresentado refere-se à análise de anomalias do modelo desenvolvido na região de 4000 a 400 cm^{-1} com 7 variáveis latentes e 25 misturas (amostras). O valor máximo para o leverage é de 0,84. Todas as amostras encontram-se dentro do limite, porém, a amostra 15 (em destaque na Figura 18), cuja concentração corresponde a glucosamina 520mg e condroitina

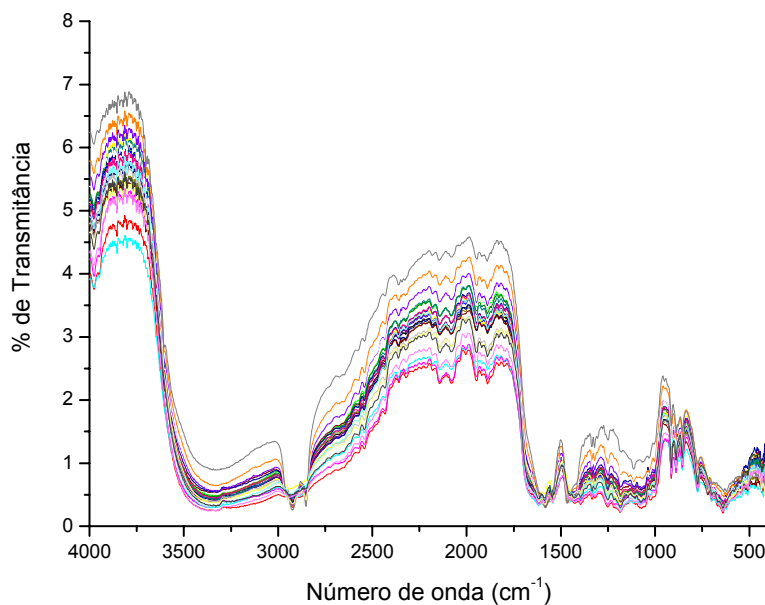
380 mg por grama de mistura, assume valor maior que o limite para resíduos de student com relação à concentração de glucosamina. Este comportamento se repetiu para os outros modelos e, portanto, esta mistura foi excluída do conjunto de calibração.

Resíduo de student acima de 2,5 demonstra que a amostra está fora do intervalo de confiança de 95% e, portanto, não está incluída na distribuição normal. O comportamento anômalo desta amostra provavelmente ocorreu por um problema no seu preparo, já que apenas a concentração de glucosamina está fora do intervalo de confiança.

5.3.2 Modelo 1

O modelo 1 foi desenvolvido na região espectral do infravermelho médio de 4000 a 400 cm^{-1} , conforme mostra a Figura 19. Para o desenvolvimento deste e dos modelos seguintes, foram utilizados os espectros de 24 misturas, pois a amostra 15 (anômala) foi excluída do conjunto de calibração.

FIGURA 19 - Espectros no infravermelho médio com reflectância difusa das misturas utilizadas no desenvolvimento do modelo 1 de calibração multivariada.



5.3.2.1 Seleção de variáveis latentes

O método de validação interna cruzada, excluindo uma amostra por vez, foi utilizado para determinação do número de variáveis latentes a ser usado na construção dos modelos de calibração multivariada. Após a análise do gráfico de PRESS pelo número de variáveis latentes (Figura 20) e da tabela correspondente (Tabela 7), foram desenvolvidos modelos com 5, 7 e 9 variáveis latentes.

FIGURA 20 - Soma dos quadrados do erro de previsão PRESS em função do número de variáveis latentes para o modelo 1

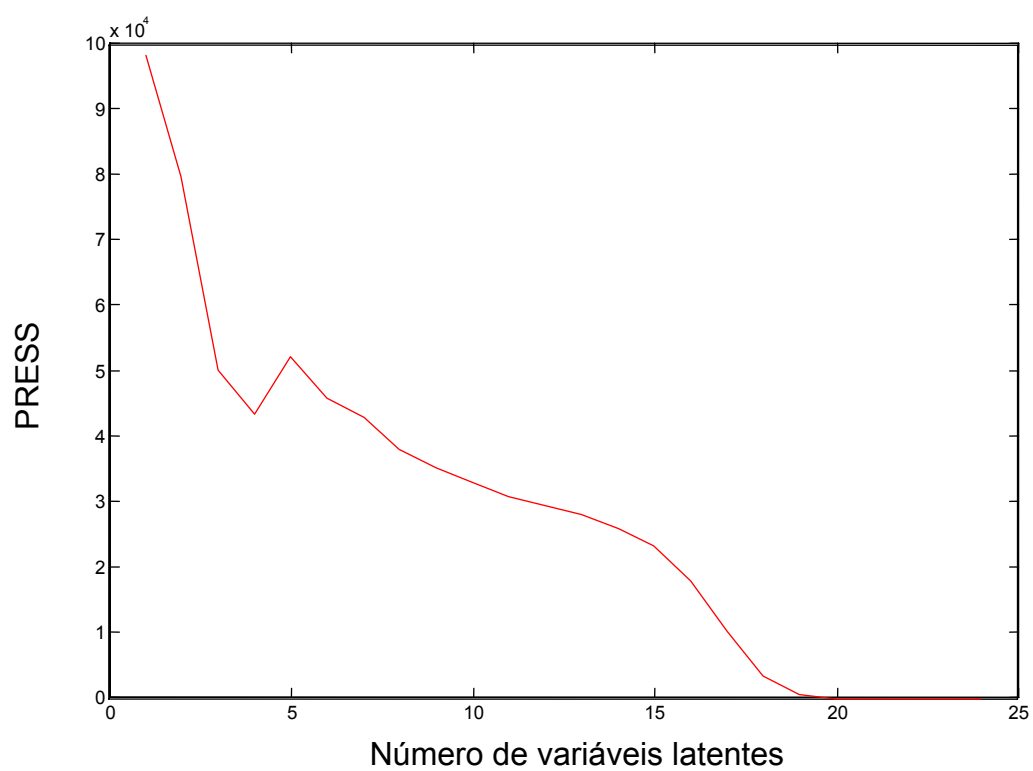


TABELA 7 - Porcentagem de variância capturada pelo método PLSR para o modelo 1 para cada variável latente.

Nº VL	Matriz X		Matriz Y	
	Cada VL	Total	Cada VL	Total
1	92.98	92.98	29.06	29.06
2	4.52	97.50	18.20	47.26
3	1.15	98.64	27.65	74.91
4	0.60	99.25	7.36	82.27
5	0.08	99.33	6.63	88.90
6	0.34	99.67	2.18	91.08
7	0.13	99.80	3.83	94.91
8	0.07	99.87	1.49	96.41
9	0.01	99.89	2.28	98.69
10	0.02	99.90	0.54	99.23
11	0.01	99.91	0.43	99.66
12	0.02	99.93	0.18	99.84
13	0.01	99.94	0.07	99.90
14	0.01	99.95	0.02	99.93
15	0.01	99.96	0.02	99.95
16	0.01	99.97	0.01	99.95
17	0.01	99.98	0.01	99.96
18	0.00	99.98	0.02	99.98
19	0.00	99.98	0.02	100.00
20	0.00	99.99	0.00	100.00
21	0.00	99.99	0.00	100.00
22	0.00	100.00	0.00	100.00
23	0.00	100.00	0.00	100.00
24	0.00	100.00	0.00	100.00

As variáveis latentes são obtidas após a compressão das matrizes com o objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis através de um número menor de fatores (variáveis latentes). Desta forma, a natureza multivariada dos dados pode ser representada em poucas dimensões. A Tabela 6 demonstra a porcentagem de variância das matrizes explicada por cada variável latente. Por exemplo, 5 variáveis latentes conseguem descrever 99,33% da variância da matriz X e 88,90% da variância da matriz Y. O critério utilizado para a escolha dos números de variáveis latentes (em destaque na figura 7) para este modelo foi o de haver uma diferença significativa de porcentagem de explicação da variância da matriz Y com relação ao número anterior de variáveis latentes. De

4 para 5 variáveis latentes, por exemplo, a porcentagem de explicação da matriz Y aumenta de 82,27% para 88,90%.

Após o desenvolvimento do modelo de calibração com 5, 7 e 9 variáveis latentes (VL), foi realizada a validação externa para a escolha do número ideal de VL. O modelo de melhor desempenho foi o desenvolvido com 7 variáveis latentes, que obteve erros médios de 2,47% para a glucosamina e 2,56% para a condroitina, como mostra a tabela 8.

TABELA 8 - Comparação dos erros médios de previsão na validação externa de acordo com o número de variáveis latentes utilizadas para o modelo 1

N° de Variáveis Latentes	Erro Médio % Glucosamina	Erro Médio % Condroitina
5	2,98	3,21
7	2,47	2,56
9	3,34	3,47

Os erros de previsão do modelo com 7 variáveis latentes para cada uma das cinco misturas não incluídas no conjunto de calibração são mostrados na tabela 9.

TABELA 9 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo 1 com 7 VL

Amostras	Concentração* Teórica		Concentração* Encontrada		Erro %	
n°	Gluco**	Condro***	Gluco	Condro	Gluco	Condro
9	480	420	463,21	431,21	3,50	-2,67
13	460	400	453,29	393,32	1,46	1,67
17	500	380	484,24	392,87	3,15	-3,39
29	520	400	511,12	411,43	1,71	-2,86
30	560	380	545,77	388,49	2,54	-2,23

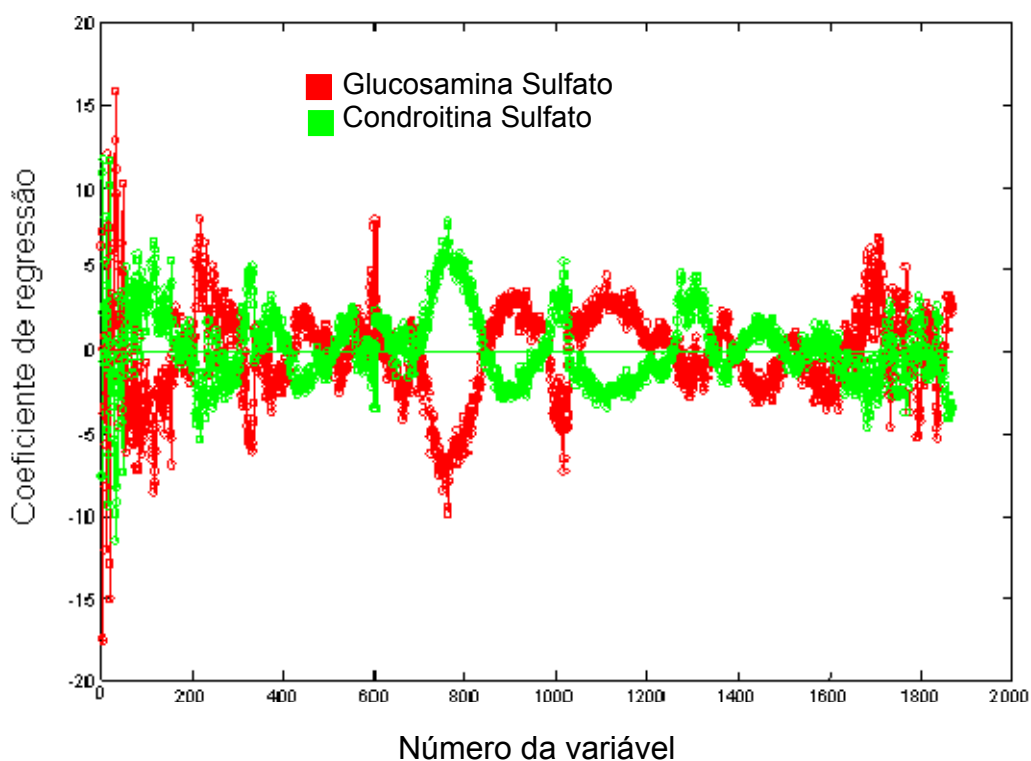
* Concentração em mg/g de mistura.

** Glucosamina

*** Condroitina

A análise dos coeficientes de regressão (Figura 21) a partir da decomposição das matrizes em 7 variáveis latentes mostra os pontos considerados no espectro da glucosamina e da condroitina que serão utilizados na previsão de novas amostras. Espera-se que quanto maior o número de coeficientes diferente de zero, maior a sensibilidade do modelo.

FIGURA 21 - Coeficientes de regressão em função do número de variáveis analisadas no conjunto de calibração do modelo 1 com 7 variáveis latentes

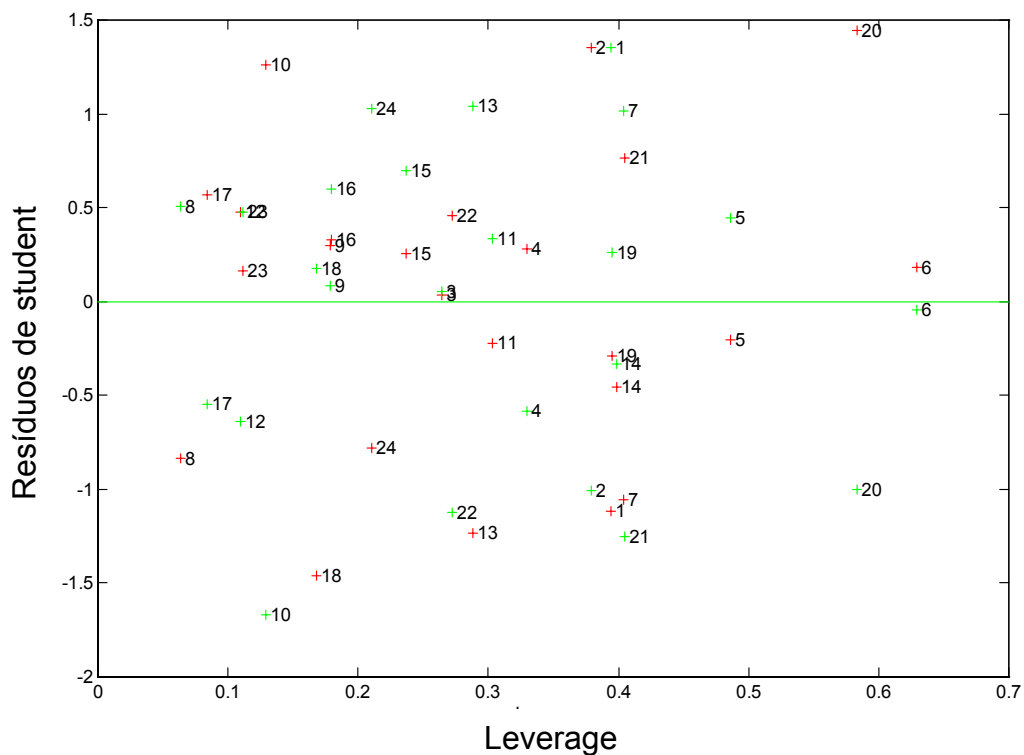


O número de pontos monitorados no gráfico (1867 números de onda) corresponde à região espectral de 4000 a 400 cm^{-1} (Quadro 4). As regiões de maior relevância estão entre as variáveis de número 750 a 1300, que correspondem ao intervalo de aproximadamente 1840 a 2900 cm^{-1} no espectro das amostras.

A análise de anomalias é mostrada na figura 22. Para este modelo, o valor máximo de leverage ($3VL/n$) é de 0,87. Neste conjunto de amostras, observa-se

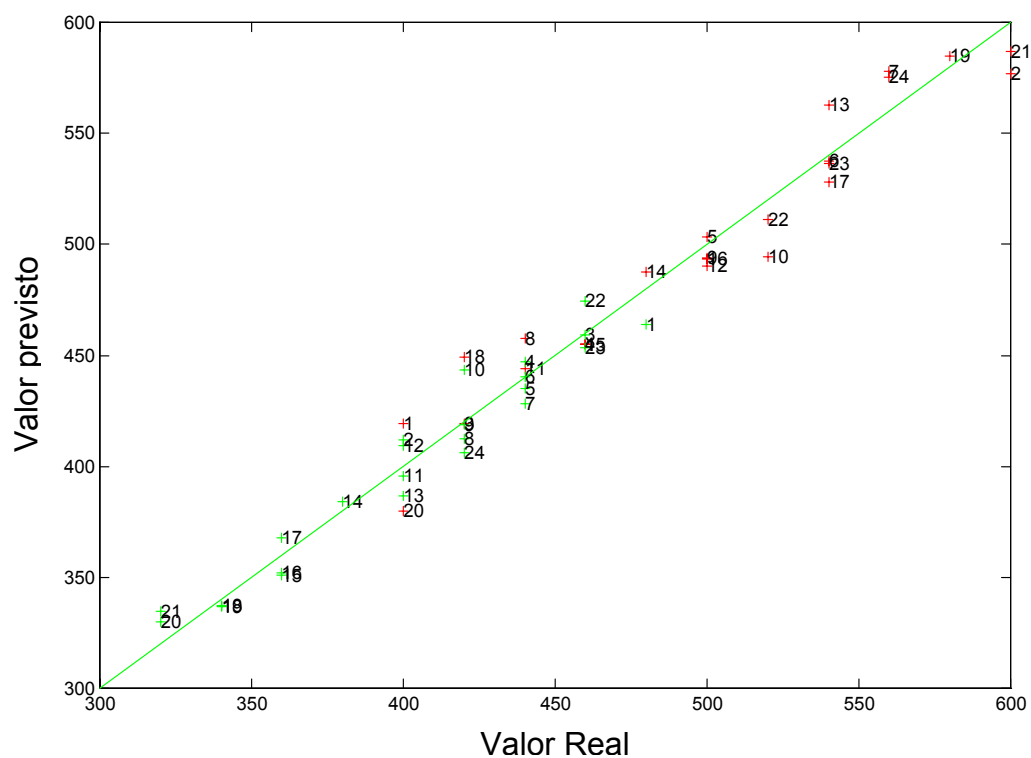
valores de resíduos de student inferiores a 2% e valores de leverage inferiores a 0,7, não havendo portanto nenhuma amostra anômala.

FIGURA 22 - Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de student na construção do modelo 1 com 7 variáveis latentes



Como descrito anteriormente, durante a construção do modelo para definição do número de variáveis latentes, foi utilizado o sistema de validação interna cruzada “leave-one-out”. A figura 23 mostra a relação entre os valores reais e valores previstos para cada amostra que foi retirada do conjunto de calibração e prevista pelo modelo.

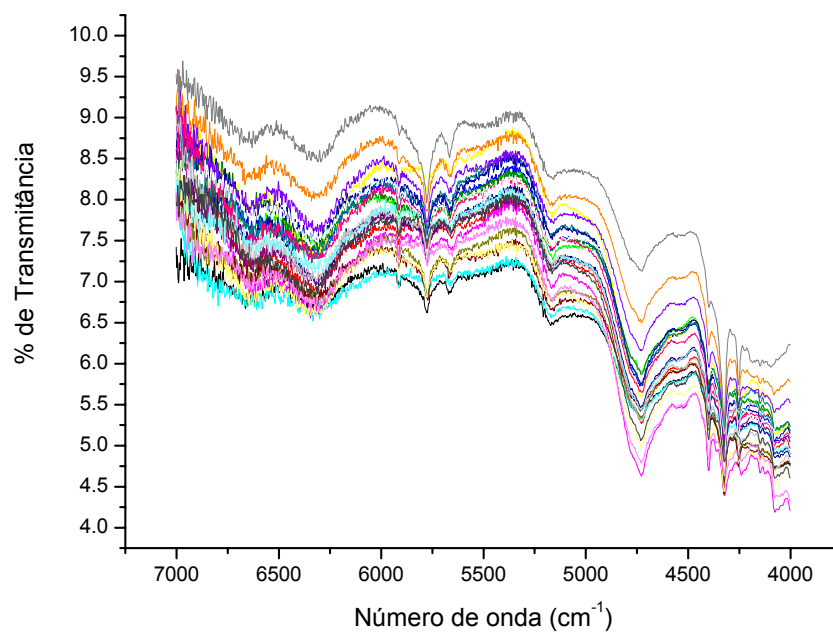
FIGURA 23 - Gráfico de valores reais por valores previstos obtidos durante a validação interna cruzada utilizando o sistema “leave-one-out” para o modelo 1



5.3.3 Modelo 2

O modelo 2 foi desenvolvido na região espectral do infravermelho médio de 7000 a 4000 cm^{-1} conforme mostra a Figura 24.

FIGURA 24 - Espectros no infravermelho médio com reflectância difusa das misturas utilizadas no desenvolvimento do modelo 2 de calibração multivariada



5.3.3.1 Seleção de variáveis latentes

Após a análise do gráfico de PRESS pelo número de variáveis latentes (Figura 25) e da tabela correspondente (Tabela 10), foram desenvolvidos modelos com 4, 5 e 7 variáveis latentes.

FIGURA 25 - Soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS) em função do número de variáveis latentes para o modelo 2

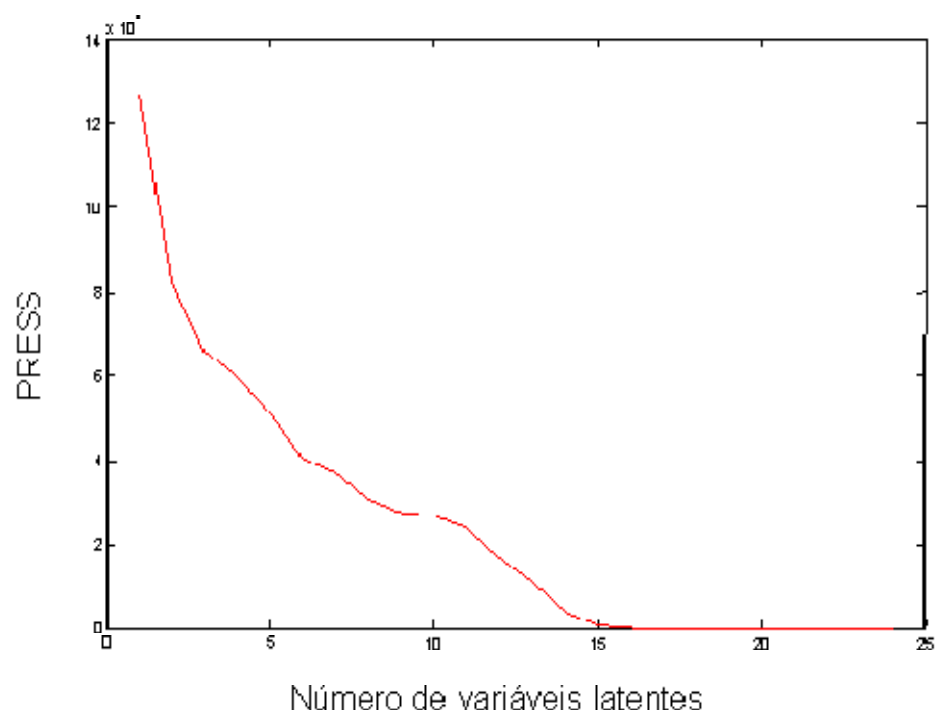


TABELA 10 - Porcentagem de variância capturada pelo método PLSR para o modelo 2

N° VL	Matriz X		Matriz Y	
	Cada VL	Total	N° VL	Cada VL
1	95.55	95.55	13.98	13.98
2	2.95	98.50	34.60	48.59
3	0.55	99.06	20.19	68.78
4	0.23	99.29	11.88	80.66
5	0.11	99.40	14.13	94.79
6	0.12	99.52	3.40	98.18
7	0.08	99.60	0.97	99.16
8	0.04	99.65	0.57	99.73
9	0.03	99.68	0.15	99.88
10	0.03	99.71	0.10	99.98
11	0.05	99.76	0.01	99.99
12	0.03	99.78	0.00	100.00
13	0.03	99.81	0.00	100.00
14	0.03	99.84	0.00	100.00
15	0.02	99.86	0.00	100.00
16	0.02	99.88	0.00	100.00
17	0.01	99.89	0.00	100.00
18	0.02	99.91	0.00	100.00
19	0.02	99.93	0.00	100.00
20	0.02	99.95	0.00	100.00
21	0.02	99.96	0.00	100.00
22	0.02	99.98	0.00	100.00
23	0.02	100.00	0.00	100.00
24	0.00	100.00	0.00	100.00

Os números de variáveis latentes escolhidos foram 4, 5 e 7 (em vermelho na tabela 10). A seleção do número de variáveis latentes, para este e para os modelos que serão descritos a seguir, obedeceu ao mesmo critério utilizado e descrito para o modelo 1.

O modelo de melhor desempenho foi o desenvolvido com 7 variáveis latentes, que obteve erros médios de 2,78% para a glucosamina e 3,43% para a condroitina como mostra a Tabela 11.

TABELA 11 - Comparação dos erros médios de previsão na validação externa de acordo com o número de variáveis latentes utilizadas para o modelo 2

Nº de Variáveis Latentes	Erro Médio % Glucosamina	Erro Médio % Condroitina	Erro Médio Total %
4	2,31	4,26	3,28
5	2,25	5,32	3,78
7	1,97	1,58	1,77

Os erros de previsão do modelo 2 com 7 variáveis latentes para cada uma das cinco misturas não incluídas no conjunto de calibração são mostrados na Tabela 12.

TABELA 12 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo 2 com 7 variáveis latentes

Amostras	Concentração Teórica*		Concentração Encontrada*		Erro %	
nº	Gluco**	Condro***	Gluco	Condro	Gluco	Condro
9	480	420	463,79	430,11	3,38	2,40
13	460	400	450,33	401,58	2,10	-0,40
17	500	380	492,48	384,13	1,50	-1,08
29	520	400	520,28	404,68	-0,05	-1,17
30	560	380	575,95	369,12	-2,85	2,86

* Concentração em mg/g de mistura.

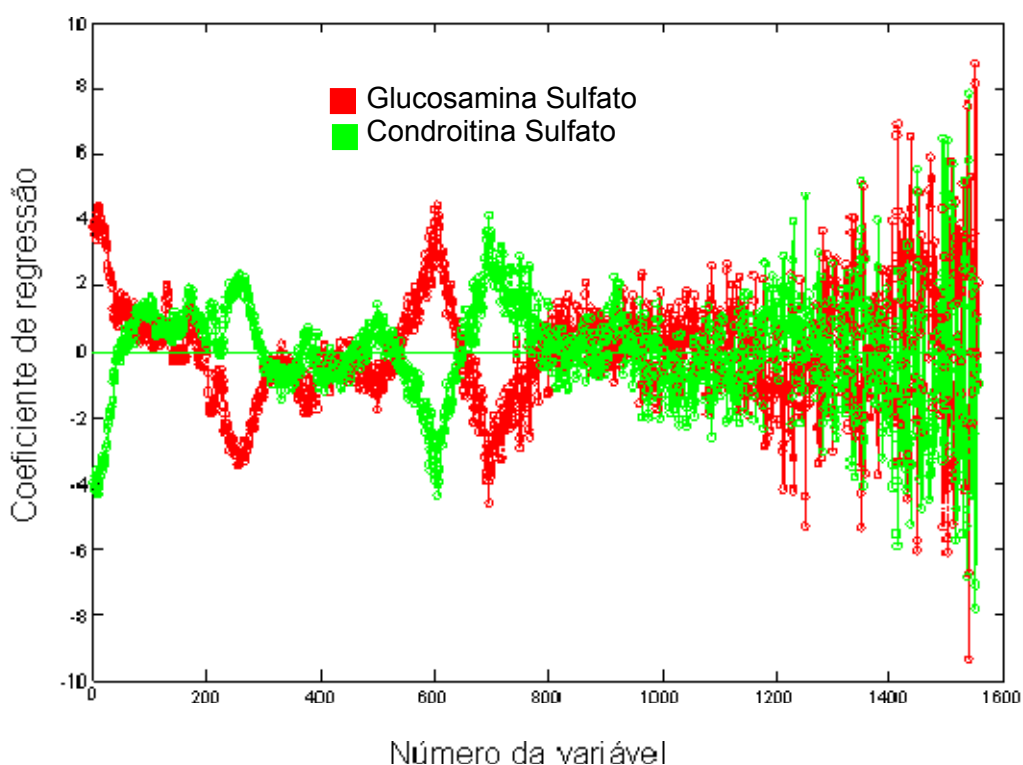
** Glucosamina

*** Condroitina

O modelo 2 selecionado (7 variáveis latentes) apresentou erros de previsão médios (1,97% e 1,58%) inferiores aos do modelo 1 (2,47% e 2,56%). O maior erro de previsão do modelo 1 foi de 3,5% para a glucosamina na mistura 9 e 3,39% para a condroitina na mistura 17, enquanto no modelo 2 os erros máximos apresentados foram de 3,38% para a glucosamina na mistura 9 e 2,86% para a condroitina na mistura 30.

Os pontos considerados no espectro da glucosamina e da condroitina que serão utilizados na previsão de novas amostras para o modelo 2 encontram-se na figura 26. Apesar dos melhores resultados de previsão do modelo 1, o gráfico de coeficiente de regressão não demonstra uma diferença significativa com relação ao número de coeficientes diferente de zero.

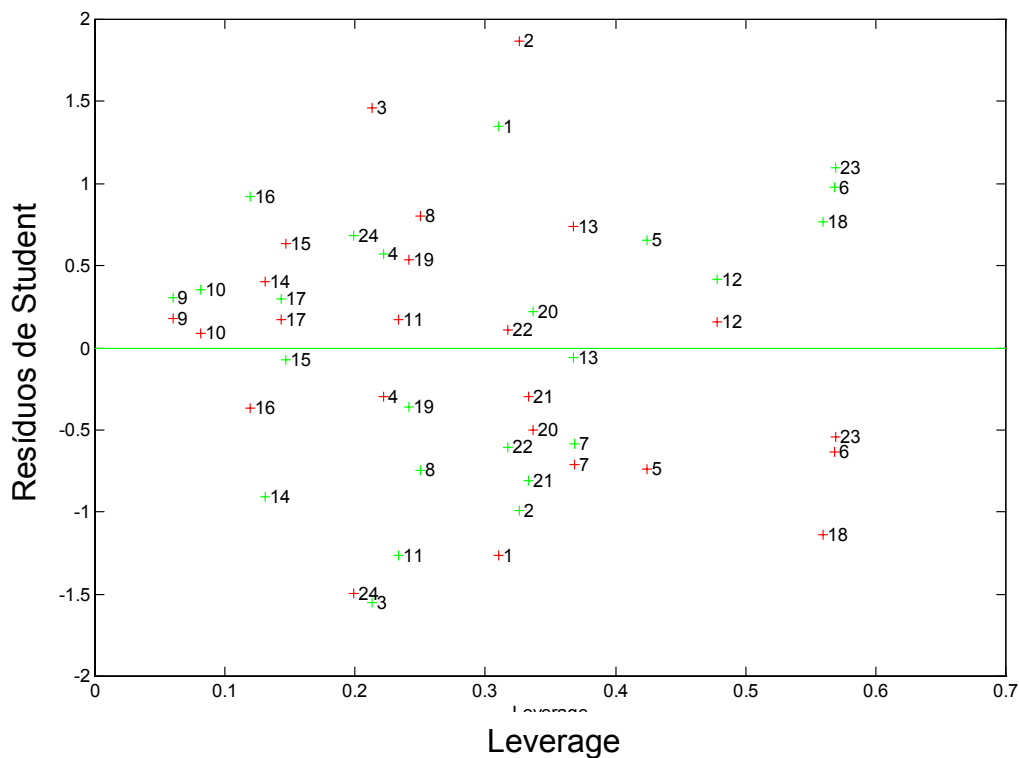
FIGURA 26 - Coeficientes de regressão em função do número de variáveis analisadas no conjunto de calibração do modelo 2 com 7 variáveis latentes



O número de pontos monitorados nos espectros das misturas correspondeu a 1557 números de onda e as regiões que se mostraram mais relevantes foram entre as variáveis 200 a 350 e 550 a 800, aproximadamente. Estas variáveis correspondem à região espectral de 4380 a 4670 cm^{-1} e 5000 a 5550 cm^{-1} respectivamente.

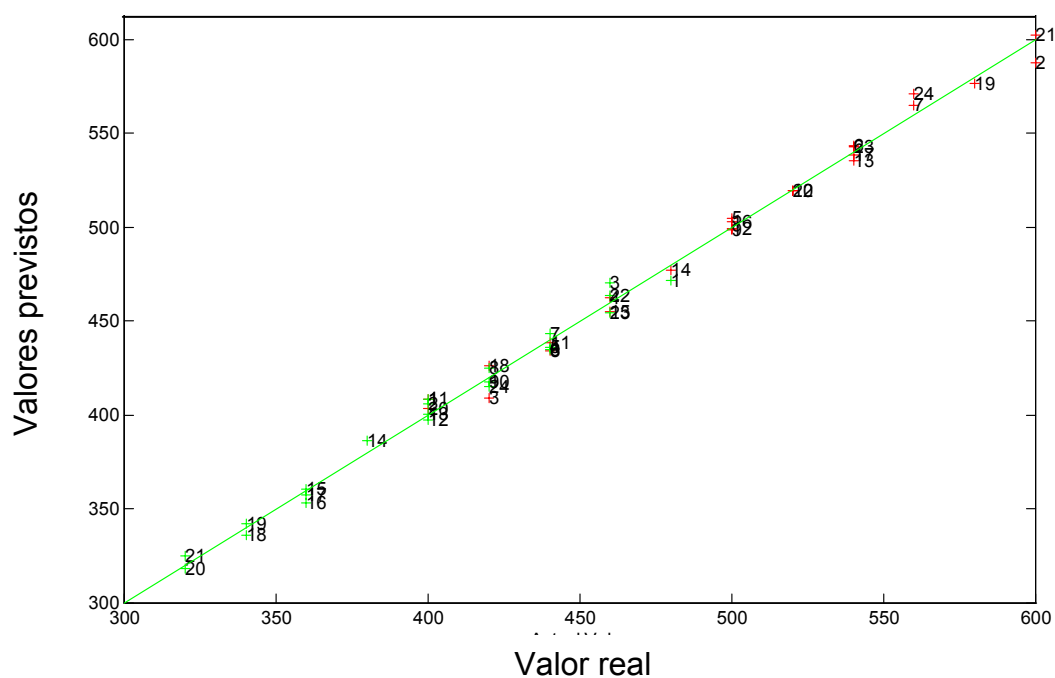
A análise de anomalias para o modelo 2 com 7 variáveis latentes foi feita com base na Figura 27. O valor máximo de leverage ($3VL/n$) assim como no modelo 1 é de 0,87, já que foram desenvolvidos com o mesmo número de variáveis latentes e de amostras. Neste conjunto de amostras observa-se valores de resíduos de student inferiores a 2% e valores de leverage inferiores a 0,7, não havendo portanto nenhuma amostra anômala.

FIGURA 27 - Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de student na construção do modelo 2 com 7 variáveis latentes



Observando-se o gráfico de valores reais por valores previstos do modelo 2 (Figura 28) é possível perceber uma maior linearidade quando comparado ao gráfico correspondente para o modelo 1 (Figura 23). Este resultado confirma a melhor capacidade de previsão observada no modelo 2.

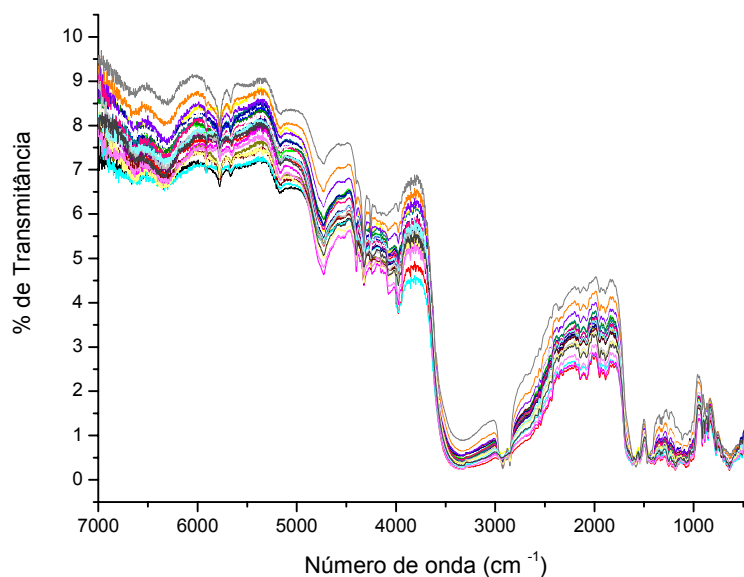
FIGURA 28 - Gráfico de valores reais por valores previstos obtidos durante a validação interna cruzada utilizando o sistema “leave-one-out” para o modelo 2



5.3.4 Modelo 3

O modelo 3 foi desenvolvido considerando-se toda a região espectral de 7000 a 400 cm^{-1} , conforme mostra a figura 29.

FIGURA 29 - Espectro no infravermelho médio com reflectância difusa das misturas utilizadas no desenvolvimento do modelo 3 de calibração multivariada



5.3.4.1 Seleção de variáveis latentes

Após a análise do gráfico de PRESS pelo número de variáveis latentes (Figura 30) e da tabela correspondente (Tabela 13), foram desenvolvidos modelos com 5, 6 e 7 variáveis latentes.

FIGURA 30 - Soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS) em função do número de variáveis latentes para o modelo 3

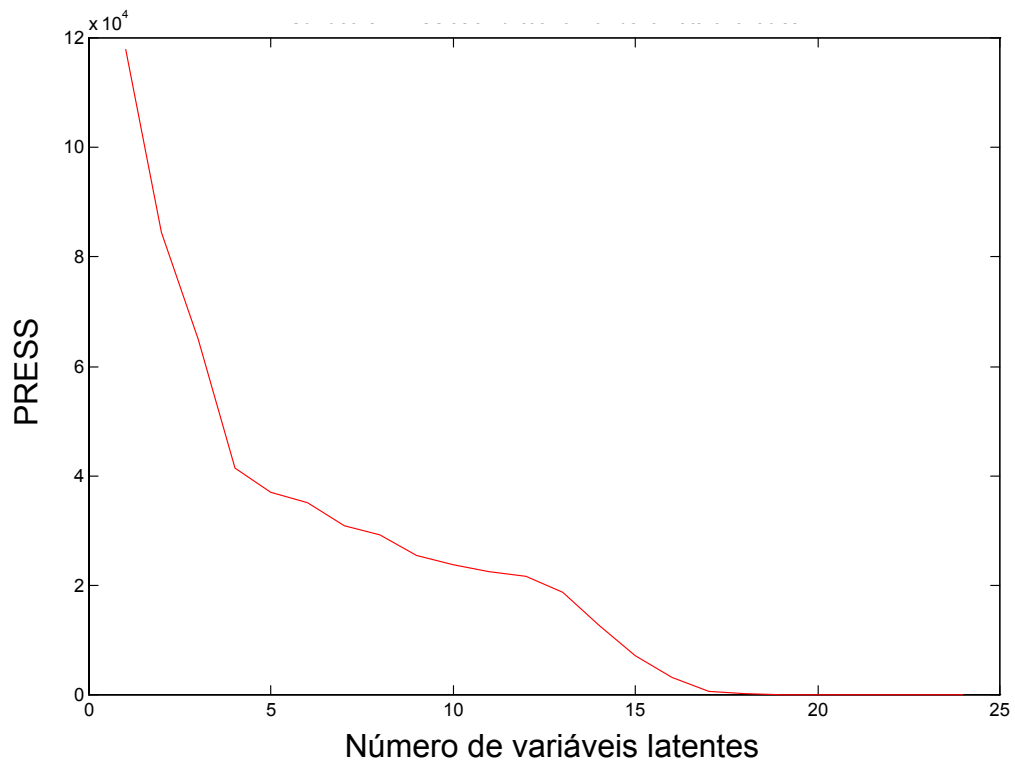


TABELA 13 - Porcentagem de variância capturada pelo método PLSR para o modelo 3

N° VL	Matriz X		Matriz Y	
	Cada VL	Total	N° VL	Cada VL
1	91.77	91.77	18.37	18.37
2	6.24	98.01	26.88	45.25
3	0.72	98.73	25.37	70.63
4	0.38	99.11	15.90	86.53
5	0.17	99.28	6.55	93.08
6	0.11	99.39	4.01	97.08
7	0.09	99.48	1.16	98.24
8	0.06	99.54	1.00	99.23
9	0.06	99.60	0.44	99.67
10	0.07	99.67	0.17	99.85
11	0.04	99.71	0.09	99.94
12	0.05	99.76	0.02	99.96
13	0.02	99.79	0.01	99.97
14	0.03	99.82	0.01	99.98
15	0.03	99.85	0.00	99.98
16	0.03	99.88	0.00	99.99
17	0.01	99.89	0.01	100.00
18	0.02	99.91	0.00	100.00
19	0.02	99.93	0.00	100.00
20	0.02	99.95	0.00	100.00
21	0.02	99.97	0.00	100.00
22	0.02	99.98	0.00	100.00
23	0.02	100.00	0.00	100.00
24	0.00	100.00	0.00	100.00

O modelo de melhor desempenho foi o desenvolvido com 5 variáveis latentes, o qual proporcionou erros médios de 1,65% para a glucosamina e 2,45% para a condroitina, como mostra a tabela 14.

TABELA 14 - Comparação dos erros médios de previsão na validação externa de acordo com o número de variáveis latentes utilizadas para o modelo 3

N° de Variáveis Latentes	Erro Médio % Glucosamina	Erro Médio % Condroitina	Erro Médio Total %
5	1,65	2,45	2,05
6	2,87	3,77	3,32
7	2,54	2,24	2,39

Os erros de previsão do modelo com 5 variáveis latentes para cada uma das cinco misturas não incluídas no conjunto de calibração são mostrados na tabela 15.

TABELA 15 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo 3 com 5 variáveis latentes

Amostras	Concentração* Real		Concentração* Prevista		Erro %	
n°	Gluco**	Condro***	Gluco	Condro	Gluco	Condro
9	480	420	466,05	426,10	2,58	-2,09
13	460	400	461,47	400,82	-0,33	-3,50
17	500	380	480,53	400,64	3,13	-5,62
29	520	400	533,88	391,87	-1,89	0,70
30	560	380	576,26	372,13	-0,31	0,53

* Concentração em mg/g de mistura.

** Glucosamina

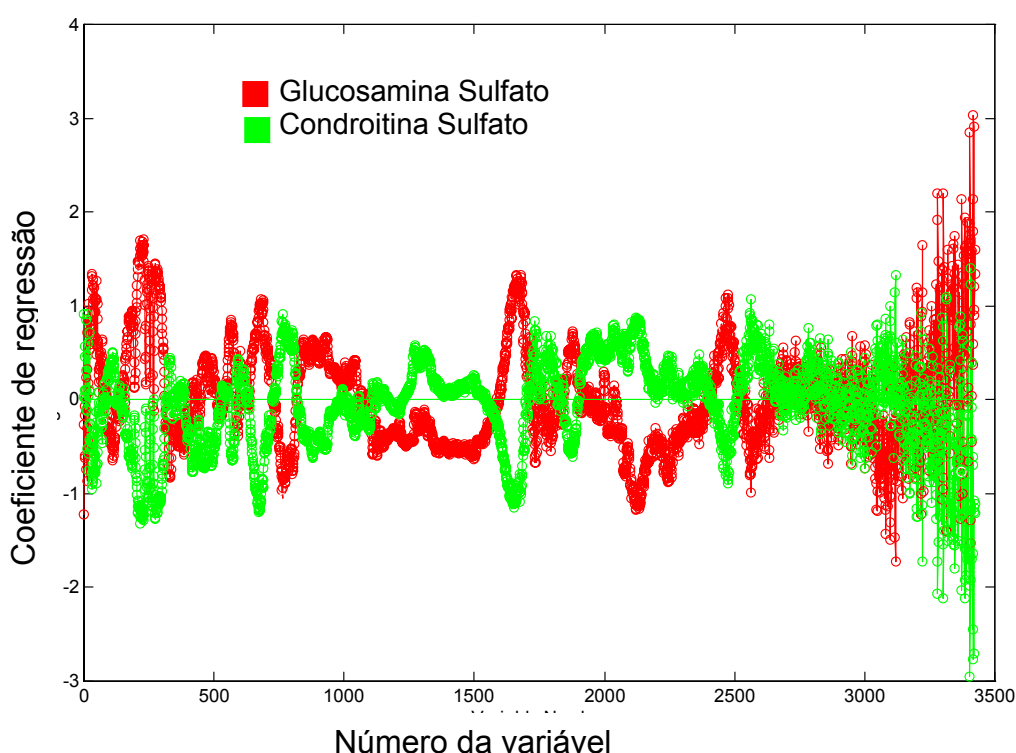
*** Condroitina

Apesar do melhor desempenho deste modelo em relação ao modelo 1, o modelo 2 ainda apresentou melhores resultados, tendo como erro médio total de previsão 1,77%, enquanto o modelo 3 apresentou 2,05%. Além disso, apresentou um erro máximo de 5,62% para a condroitina na mistura 17, enquanto o erro máximo apresentado pelo modelo 2 foi de 3,38 para a glucosamina na mistura 9.

Na análise do gráfico de coeficiente de regressão (Figura 31) é possível identificar uma maior quantidade de pontos monitorados nos espectros das

substâncias, o que se deve ao fato de este modelo considerar toda a região espectral. Com relação ao número de coeficientes diferentes de zero, não houve uma diferença significativa com relação aos outros modelos.

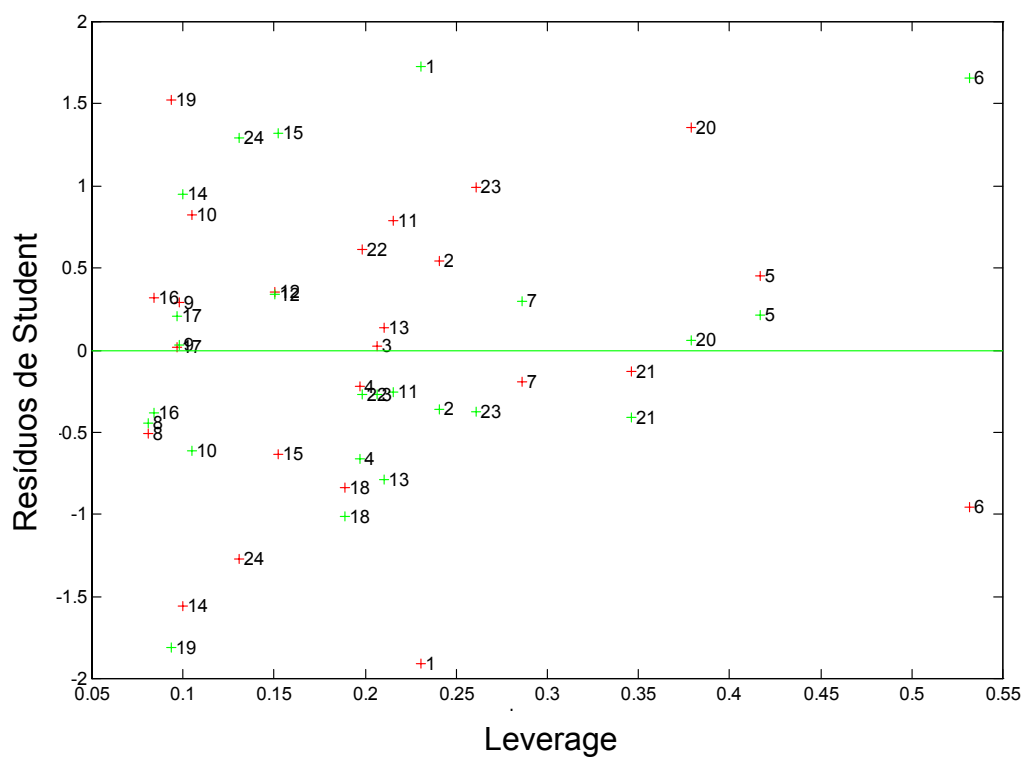
FIGURA 31 - Coeficientes de regressão em função do número de variáveis analisadas no conjunto de calibração do modelo 3 com 5 variáveis latentes



As regiões espectrais de maior relevância para a construção do modelo 3 corresponderam ao intervalo de números de onda 2100 a 5219 cm^{-1} .

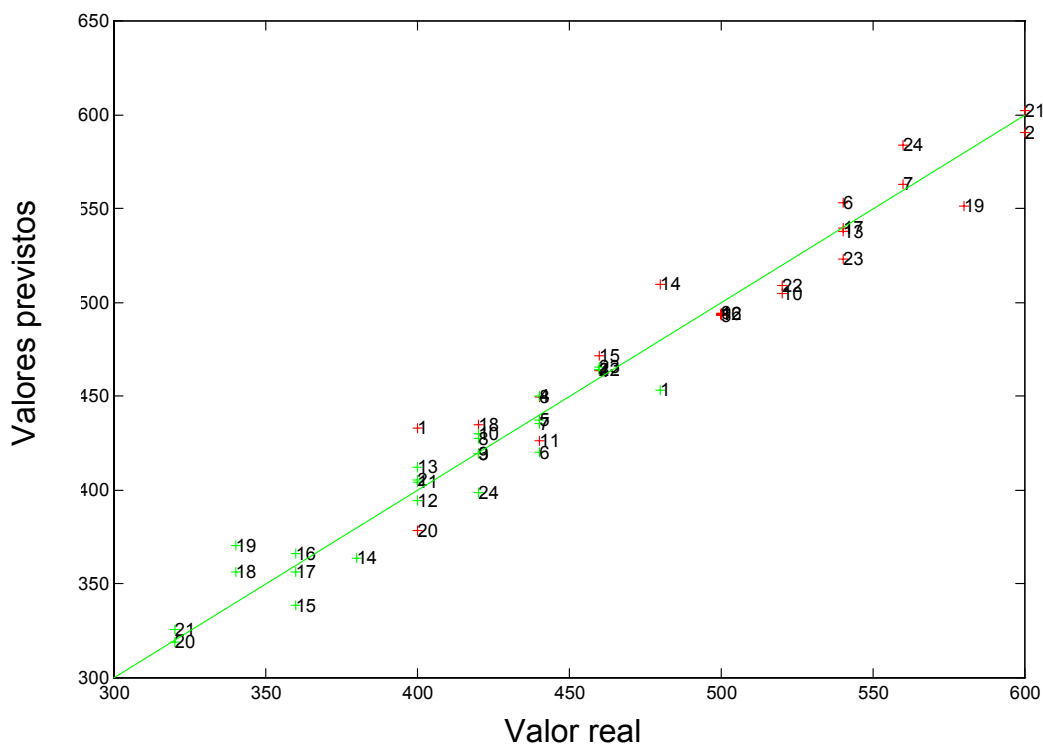
A análise de anomalias para o modelo 3 com 5 variáveis latentes foi feita com base na figura 32. O valor máximo aceito para o leverage é de 0,6. Nenhuma amostra demonstrou comportamento anômalo neste modelo, pois todas apresentaram valores de resíduos de student inferiores a 2,5 e valor de leverage inferior a 0,55.

FIGURA 32 - Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de student na construção do modelo 3 com 5 variáveis latentes



A figura 33 traz o gráfico de valores reais por valores previstos para este modelo. É possível observar uma menor linearidade dos valores em relação ao modelo 2.

FIGURA 33 - Gráfico de valores reais por valores previstos obtidos durante a validação interna cruzada utilizando-se o sistema “leave-one-out” para o modelo 3



5.3.5 Modelo 4

O modelo 4 foi construído considerando-se a região espectral de 6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500 cm^{-1} . Para a seleção destas regiões espectrais, observou-se o espectro das substâncias puras (glucosamina e condroitina), o qual foi comparado com o espectro das misturas. As regiões de ruído foram eliminadas e foram selecionadas regiões em que houve boa reprodução das bandas dos espectros das substâncias puras no espectro das misturas. A figura 15 exemplifica o processo de seleção das regiões do espectro.

5.3.5.1 Seleção de variáveis latentes

Após a análise do gráfico de PRESS pelo número de variáveis latentes (Figura 34) e da tabela correspondente (Tabela 16), foram desenvolvidos modelos com 4, 5 e 7 variáveis latentes.

FIGURA 34 - Soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS) em função do número de variáveis latentes do modelo 4

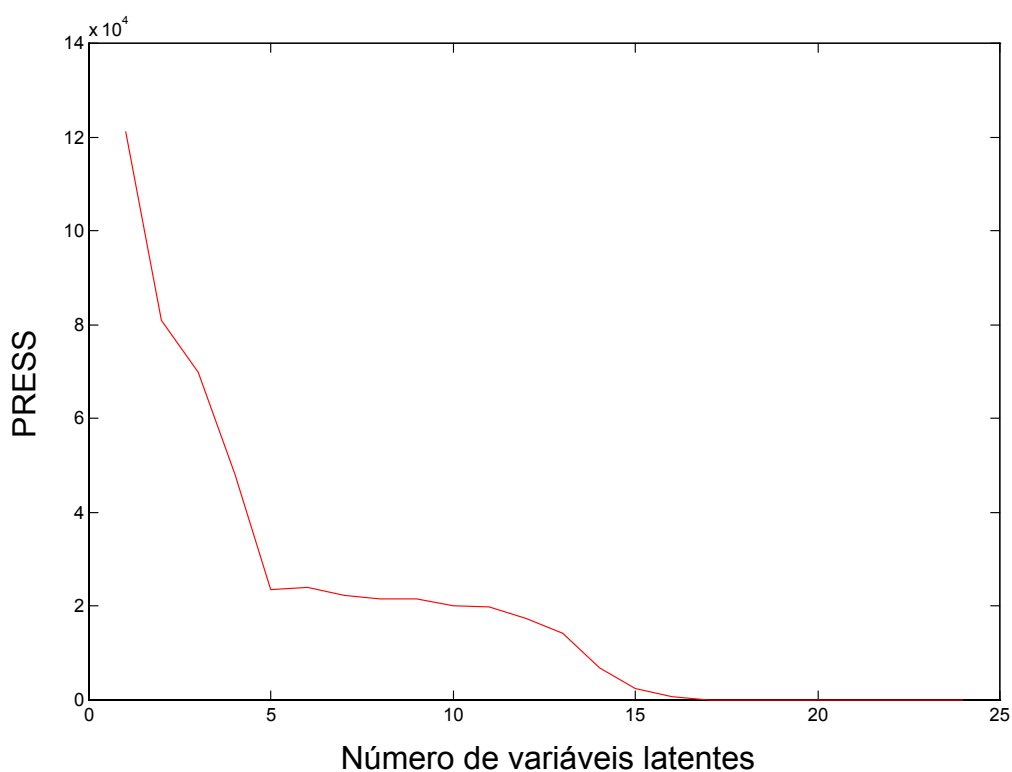


TABELA 16 - Porcentagem de variância capturada pelo método PLS para o modelo 4

N° VL	Matriz X		Matriz Y	
	Cada VL	Total	N° VL	Cada VL
1	96.70	95.70	16.80	16.80
2	3.51	99.21	30.23	47.03
3	0.43	99.64	15.77	62.79
4	0.16	99.80	18.79	81.58
5	0.05	99.85	13.09	94.67
6	0.03	99.88	2.50	97.17
7	0.03	99.91	1.14	98.31
8	0.01	99.92	1.03	99.33
9	0.01	99.93	0.34	99.67
10	0.01	99.94	0.24	99.91
11	0.01	99.95	0.03	99.94
12	0.00	99.95	0.03	99.97
13	0.01	99.96	0.01	99.98
14	0.00	99.96	0.01	99.98
15	0.00	99.97	0.01	99.99
16	0.00	99.97	0.01	100.00
17	0.01	99.98	0.00	100.00
18	0.00	99.99	0.00	100.00
19	0.00	99.99	0.00	100.00
20	0.00	99.99	0.00	100.00
21	0.01	100.00	0.00	100.00
22	0.00	100.00	0.00	100.00
23	0.00	100.00	0.00	100.00
24	0.00	100.00	0.00	100.00

Os modelos de calibração foram desenvolvidos com 4, 5 e 7 variáveis latentes. O modelo de melhor desempenho foi o desenvolvido com um número de 5 variáveis latentes que está relacionado a uma diminuição significativa do PRESS, como demonstrado na figura 35. Os erros médios de previsão para este modelo foram de 1.37% para a glucosamina e 1.30% para a condroitina como mostra a Tabela 17.

TABELA 17 - Comparação dos erros médios de previsão na validação externa de acordo com o número de variáveis latentes utilizadas para o modelo 4

Nº de Variáveis Latentes	Erro Médio % Glucosamina	Erro Médio % Condroitina
4	2,54	3,23
5	1,37	1,30
7	3,89	3,73

Os erros de previsão do modelo com 5 variáveis latentes para cada uma das misturas na validação externa são mostrados na tabela 18.

TABELA 18 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo 4 com 5 variáveis latentes

Amostras	Concentração* Real		Concentração* Prevista		Erro %	
nº	Gluco**	Condro***	Gluco	Condro	Gluco	Condro
9	480	420	475.43	429.38	0,95	-2,23
13	460	400	449.77	398.92	2,22	0,27
17	500	380	492.28	389.67	1,54	-2,54
29	520	400	530.22	395.80	-1,97	1,05
30	560	380	561.02	381.64	-0,18	-0,43

* Concentração em mg/g de mistura.

** Glucosamina

*** Condroitina

O modelo 4 com 5 variáveis latentes apresentou erros médios de previsão menores do que os modelos 1, 2 e 3, conforme tabela 19.

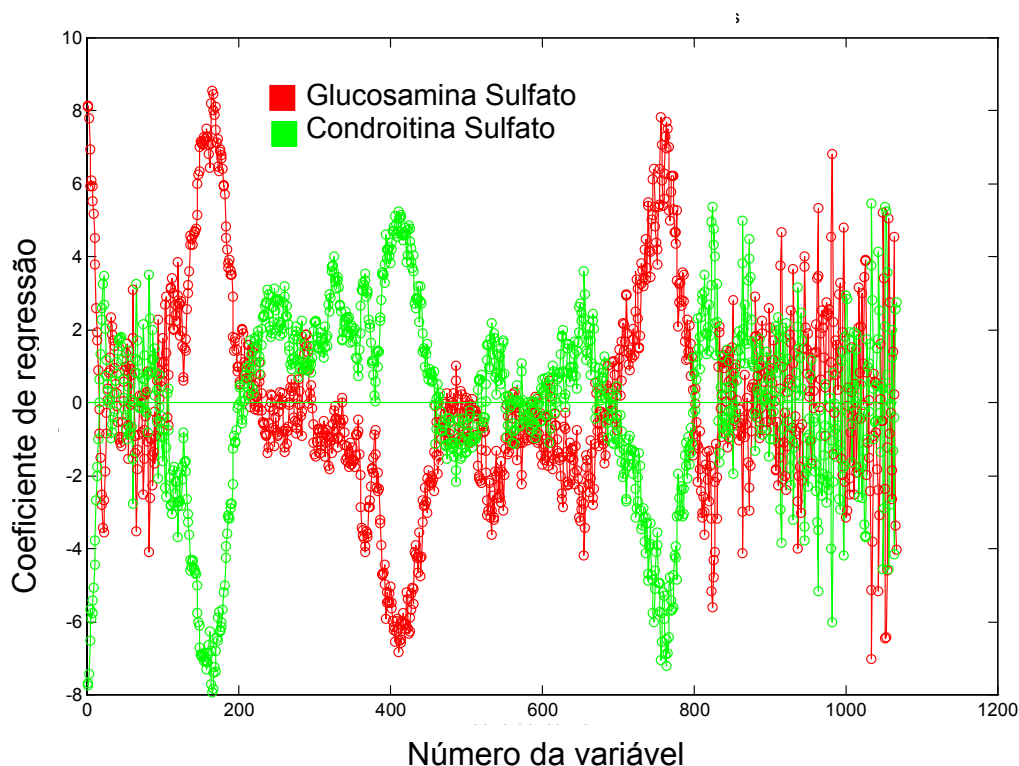
TABELA 19 - Comparação dos erros médios de previsão dos quatro modelos de calibração multivariada desenvolvidos

Modelo	Erro Médio % Glucosamina	Erro Médio % Condroitina
1	2,47	2,56
2	1,97	1,58
3	1,65	2,45
4	1,37	1,30

Os erros individuais para o modelo 4 também foram menores, tendo-se como erros máximos 2,22% para a glucosamina na mistura 13 e 2,54% para a condroitina na mistura 17.

Na análise do gráfico de coeficientes de regressão (figura 35) é possível detectar um número muito maior de coeficientes diferentes de zero em comparação aos outros modelos, o que comprova a maior sensibilidade do modelo 4.

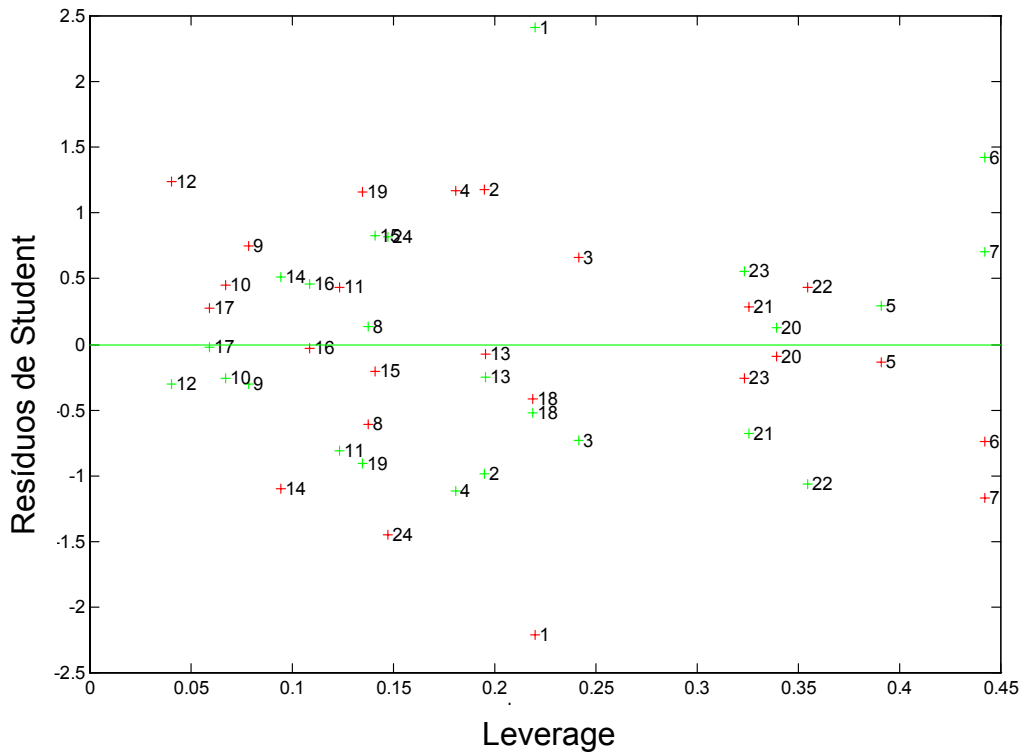
FIGURA 35 - Coeficientes de regressão em função do número de variáveis analisadas no conjunto de calibração do modelo 4 com 5 variáveis



Além disso, praticamente toda a região espectral se mostrou relevante para a construção do modelo de calibração. O intervalo de números de onda mais significativo foi de 4000 a 5300 cm^{-1} aproximadamente.

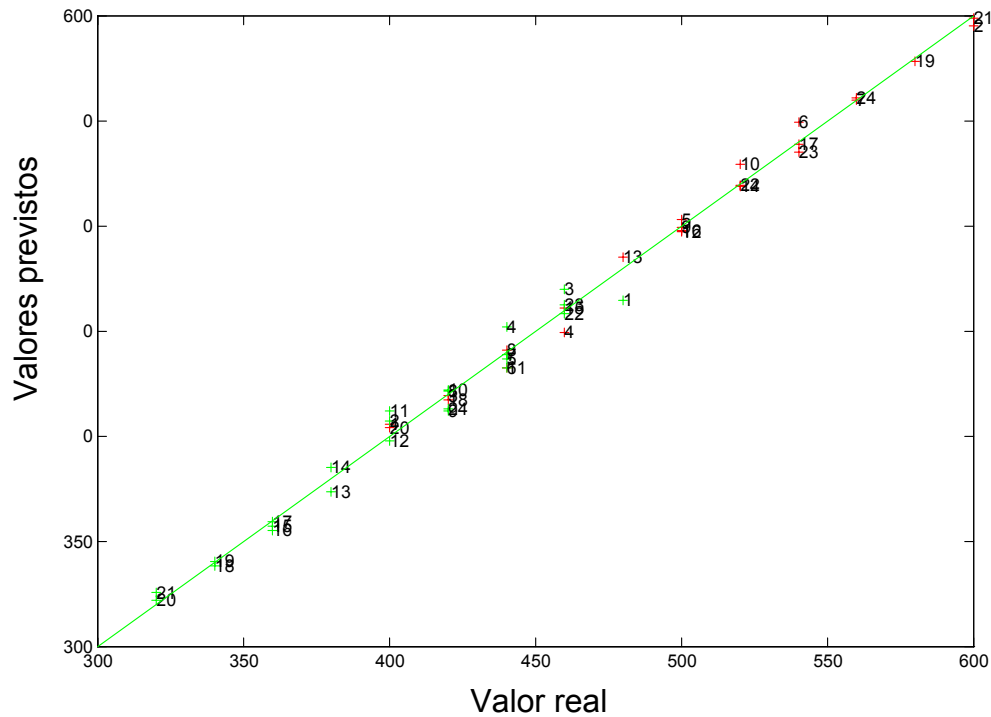
O gráfico de leverage por resíduos de student (Figura 36) demonstra a inexistência de amostras anômalas para este modelo considerando-se que todas as amostras apresentaram valores de resíduos de student inferiores a 2,5 e valores de leverage inferiores a 0,45 (valor máximo = 0,6).

FIGURA 36 - Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de student na construção do modelo 4 com 5 variáveis latentes



Observando-se o gráfico de valores reais por valores previstos do modelo 4 (Figura 37), é possível perceber uma maior linearidade quando comparado aos gráficos correspondentes dos demais modelos (Figuras 23, 28 e 33). Este resultado pode estar relacionado à melhor capacidade de previsão observada no modelo 4.

FIGURA 37 - Gráfico de valores reais por valores previstos obtidos durante a validação interna cruzada utilizando-se o sistema “leave-one-out” para o modelo 4.



5.4 PRÉ-TRATAMENTOS

Após a seleção da região espectral ideal para o desenvolvimento do modelo (modelo 4), outros dois modelos foram desenvolvidos, partindo-se dos espectros nesta mesma região com pré-tratamentos, na tentativa de intensificar as bandas e diminuir ruídos.

O desenvolvimento destes modelos obedeceu ao mesmo padrão de desenvolvimentos dos anteriores, realizando-se o número ideal de variáveis latentes e a análise de anomalias.

Os resultados dos modelos em que se utilizou correção do fator multiplicativo do sinal (MSC) e alisamento com primeira derivada são mostrados nas tabelas 20 e 21 respectivamente.

TABELA 20 - Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo desenvolvido na região espectral de 6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500 cm^{-1} com pré-tratamento (MSC) e duas variáveis latentes

Amostras n°	Concentração* Real		Concentração* Prevista		Erro %	
	Glucosamina	Condroitina	Glucosamina	Condroitina	Glucosamina	Condroitina
9	480	420	484,87	397,44	-1,01	5,37
13	460	400	467,45	391,01	-1,62	2,25
17	500	380	481,90	396,35	3,62	4,30
29	520	400	516,30	409,04	0,71	2,26
30	560	380	530,58	414,31	5,25	9,03

TABELA 21 – Resultado da validação externa para cada uma das misturas de previsão para o modelo desenvolvido na região espectral de 6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500 cm^{-1} utilizando-se 1° derivada e alisamento dos espectros e duas variáveis latentes

Amostras n°	Concentração* Real		Concentração* Prevista		Erro %	
	Glucosamina	Condroitina	Glucosamina	Condroitina	Glucosamina	Condroitina
9	480	420	392,40	317,28	18,25	24,46
13	460	400	406,99	336,59	11,52	15,85
17	500	380	497,08	404,58	0,58	-6,47
29	520	400	530,91	422,22	-2,10	-5,56
30	560	380	524,56	415,13	6,33	-9,24

* Concentração em mg/g de mistura.

** Glucosamina

*** Condroitina

É possível observar erros maiores de previsão dos modelos com pré-tratamento, especialmente no que utilizou derivação e alisamento. A comparação dos erros médios de previsão do modelo sem pré-tratamento com os que receberam pré-tratamento é mostrada na tabela 22.

TABELA 22 - Comparação dos erros médios de previsão dos modelos desenvolvidos na região espectral de região espectral de 6400-6200/ 5950-5700/ 5300-3800/ 1600-1500 cm^{-1} sem pré-tratamento e com pré-tratamentos.

Modelo	Erro Médio % Glucosamina	Erro Médio % Condroitina
Sem pré tratamento (modelo 4)	2,98	3,21
MSC	2,44	4,64
Alisamento e derivação	7,75	12,32

O alisamento e cálculo da derivada foram utilizados para corrigir variações na linha de base e reduzir os efeitos de ruídos. Entretanto, o resultado obtido foi bastante inferior se comparado ao modelo sem pré-tratamento. Uma possível explicação é de que os filtros de suavização de ruído instrumental atuam diretamente sobre o sinal analítico e não sobre as frequências que compõem tal sinal. Esta característica torna os filtros de suavização pouco seletivos, isto é, incapazes de diferenciar o que é sinal do que é ruído e, portanto, no processo de suavização de ruído, uma parte da informação útil contida no sinal é simultaneamente removida (CERQUEIRA, POPPI & KUBOTA, 2000).

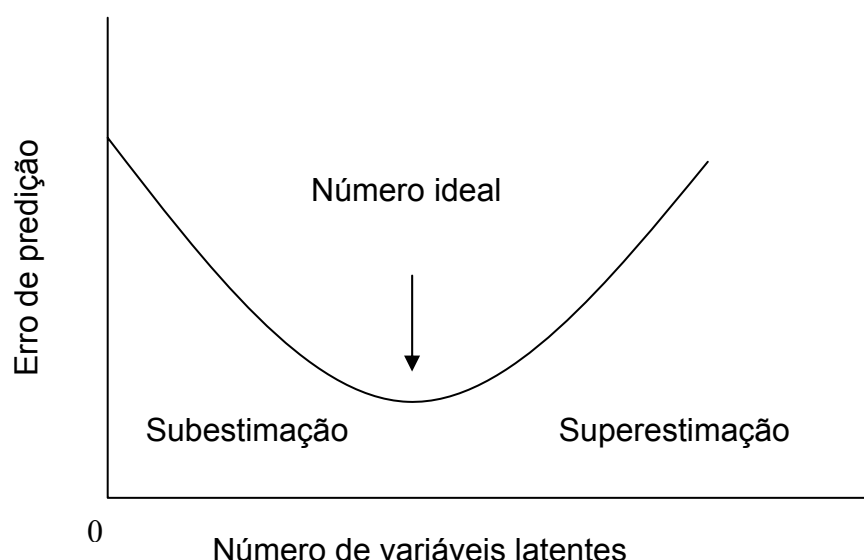
5.5 SELEÇÃO DO MODELO

A espectroscopia no infravermelho, principalmente na análise quantitativa, apresenta alguns interferentes, como regiões de ruídos associados ao instrumento que poderão limitar o uso de algumas regiões características do espectro. Além disso, a técnica de reflectância difusa exige um preparo cuidadoso

das amostras, pois variáveis como o tamanho e a forma das partículas, o espaço livre entre elas e o grau de compactação poderão interferir na resposta espectral e, portanto, na quantificação das substâncias. Apesar da possível interferência destes fatores, todos os modelos desenvolvidos apresentaram boa capacidade de previsão, tendo erros médios inferiores a 4%, sendo que o modelo 4 apresentou erros inferiores a 1,35%.

Dois pontos mostraram-se fundamentais para obtenção do modelo de melhor resultado. O primeiro foi a seleção do número ideal de variáveis latentes que conseguisse uma boa correlação das matrizes X e Y, de tal forma que o resultado do modelo não fosse superestimado ou subestimado, ou seja, fazendo-se com que ele classificasse informações irrelevantes como relevantes ou informações relevantes como irrelevantes. O esquema da figura 38 demonstra este raciocínio.

FIGURA 38 - Desenho esquemático do erro de predição em função do número de variáveis latentes.



Este resultado demonstra que existe um número ideal de variáveis latentes que não corresponde necessariamente àquele que consegue explicar a maior variação das matrizes. O valor ideal é aquele que explica a variância sem superestimá-la.

O segundo ponto foi a seleção da região espectral, pois quando se considerou apenas as regiões onde o espectro da mistura manteve bandas de absorção características conforme observado nos espectros das substâncias puras obteve-se o modelo de melhor resultado. Em geral, espera-se que quanto mais informação espectral, melhor o resultado do modelo de calibração (LORBER & KOWALSKI, 1998). No entanto, isso não foi observado neste trabalho, o que confirma resultados já mostrados por outros autores (KALIVAS, ROBERTS & SUTTER, 1989; RIMBAUD *et al*, 1997). De modo geral, quando se considera toda a região espectral, há uma perda de sensibilidade do modelo, pois nele são incluídas regiões cujas informações não são relevantes no processo de quantificação, uma vez que ou se trata de regiões de ruído instrumental ou de regiões não características das substâncias que se quer quantificar.

5.6 VALIDAÇÃO

5.6.1 Especificidade e seletividade

De acordo com o INMETRO (2003), um método que produz respostas para vários analitos presentes em uma matriz, mas que pode distinguir a resposta de um analito das de outros, é considerado seletivo. Considerando que o método desenvolvido é capaz de determinar cada uma das substâncias de interesse (glucosamina e condroitina) na presença de interferente (excipiente), pode-se dizer que o método apresenta seletividade.

5.6.2 Precisão

As análises de precisão realizadas foram repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corridas). A reprodutibilidade do método não foi analisada pela indisponibilidade de outro laboratório para a realização das análises.

5.6.2.1 Repetibilidade

Para cada concentração foram preparadas três misturas que foram lidas em triplicata gerando 9 resultados para cada concentração. Os resultados das réplicas de leitura não estão apresentados individualmente, mas em valor médio. Nas tabelas 23, 24, 25 e 26 são apresentadas as médias de previsão, a média final de previsão obtida, o desvio padrão e o coeficiente de variação para as misturas 1, 14, 24 e 25 respectivamente. Os resultados do ensaio de repetibilidade mostram um coeficiente de variação inferior a 2,17, valor bastante abaixo da variação máxima aceita para este teste (5%).

TABELA 23 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 1 no ensaio de repetibilidade

Mistura 1	Glucosamina-6-sulfato 400 mg/ g de mistura	Condroitina-6-sulfato 480 mg/ g de mistura
Valores encontrados (mg/g)	406,11 393,23 395,32	475,53 488,28 482,21
Média (mg/g)	398,22	482,01
Desvio padrão absoluto	6,91	6,38
Coeficiente de Variação (%)	1,74	1,32

TABELA 24 - Resultados da determinação da glucosamina e condroitina na mistura 14 no ensaio de repetibilidade

Mistura 14	Glucosamina-6-sulfato 500 mg/g de mistura	Condroitina-6-sulfato 400 mg/g de mistura
Valores encontrados (mg/g)	498,96	408,88
	510,67	410,02
	512,40	397,50
Média (mg/g)	507,34	405,47
Desvio padrão absoluto	7,31	6,92
Coeficiente de Variação (%)	1,44	1,71

TABELA 25 - Resultados da determinação da glucosamina e condroitina na mistura 24 no ensaio de repetibilidade

Mistura 24	Glucosamina-6-sulfato 400 mg/g de mistura	Condroitina-6-sulfato 320 mg/g de mistura
Valores encontrados (mg/g)	390,74	322,31
	388,78	325,33
	396,53	319,56
Média (mg/g)	392,02	322,40
Desvio padrão absoluto	4,03	2,89
Coeficiente de Variação (%)	1,03	0,90

TABELA 26 - Resultados da determinação da glucosamina e condroitina na mistura 25 no ensaio de repetibilidade

Mistura 25	Glucosamina-6-sulfato 600 mg/g de mistura	Condroitina-6-sulfato 320 mg/g de mistura
Valores encontrados (mg/g)	605,98	316,03
	595,23	329,87
	593,74	324,89
Média (mg/g)	598,32	323,60
Desvio padrão absoluto	6,68	7,01
Coeficiente de Variação (%)	1,12	2,17

5.6.2.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada em dois dias diferentes com intervalo de sete dias por dois analistas no mesmo laboratório e com o mesmo equipamento.

As tabelas 27, 28, 29 e 30 mostram as médias dos valores previstos para cada concentração nos dois dias de análise, a média final obtida, o desvio padrão e o coeficiente de variação para as misturas 1, 14, 24 e 25 respectivamente. Os resultados obtidos mostram coeficientes de variação inferiores a 2,73 que se encontram abaixo do valor máximo permitido para este teste (5%) sendo considerados, portanto, aceitáveis.

TABELA 27 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 1 no ensaio de precisão intermediária

Mistura 1	Glucosamina-6-sulfato 400 mg/g de mistura	Condroitina-6-sulfato 480 mg/g de mistura
Determinações do analista 1	406,11	475,53
	393,23	488,28
	395,32	482,21
Determinações do analista 2	410,74	485,34
	418,60	486,89
	408,88	477,73
Média (mg/g)	402,48	482,66
Desvio padrão absoluto	6,71	5,14
Coeficiente de Variação (%)	1,67	1,06

TABELA 28 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 14 no ensaio de precisão intermediária

Mistura 14	Glucosamina-6-sulfato 500 mg/g de mistura	Condroitina-6-sulfato 400 mg/g mistura
Determinações do analista 1	498,96	408,88
	510,67	410,02
	512,40	397,50
Determinações do analista 2	518,29	394,32
	506,22	389,87
	520,21	386,21
Média (mg/g)	511,13	397,80
Desvio padrão absoluto	7,85	9,81
Coeficiente de Variação (%)	1,54	2,47

TABELA 29 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 24 no ensaio de precisão intermediária

Mistura 24	Glucosamina-6-sulfato 400 mg/g de mistura	Condroitina-6-sulfato 320 mg/g de mistura
Determinações do analista 1	390,74	322,31
	388,78	325,33
	396,53	319,56
Determinações do analista 2	412,81	315,89
	409,28	305,65
	412,12	312,73
Média (mg/g)	401,71	316,91
Desvio padrão absoluto	10,98	7,10
Coeficiente de Variação (%)	2,73	2,24

TABELA 30 - Resultados da determinação de glucosamina e condroitina na mistura 25 no ensaio de precisão intermediária

Mistura 25	Glucosamina-6-sulfato 600 mg/g de mistura	Condroitina-6-sulfato 320 mg/g de mistura
Determinações do analista 1	605,98	316,03
	595,23	329,87
	593,74	324,89
Determinações do analista 2	610,74	312,23
	612,78	306,43
	602,89	315,87
Média (mg/g)	603,56	319,55
Desvio padrão absoluto	7,86	6,57
Coeficiente de Variação (%)	1,30	2,06

5.6.3 Exatidão

A exatidão do modelo multivariado foi avaliada por ensaio de recuperação em que quantidades conhecidas dos fármacos foram adicionadas ao excipiente estearato de magnésio. De acordo com a ANVISA (2003), os valores de recuperação devem estar entre 98 e 102% com relação ao valor esperado.

Os resultados do ensaio de recuperação para cada uma das misturas são demonstrados nas tabelas 31, 32, 33 e 34.

TABELA 31 - Resultados do teor de glucosamina e condroitina para a mistura 1 no ensaio de recuperação

Mistura 1	Glucosamina-6-sulfato	Condroitina-6-sulfato
Valores encontrados (mg/g de mistura)	406,11 393,23 395,32	475,53 488,28 482,21
Coefficiente de Variação (%)	1,74	1,32
Média (mg/g)	398,22	482,01
Valor esperado (mg/g de mistura)	400,00	480,00
Porcentagem de recuperação	99,56	100,42

TABELA 32 - Resultados do teor de glucosamina e condroitina para a mistura 14 no ensaio de recuperação

Mistura 14	Glucosamina-6-sulfato	Condroitina-6-sulfato
Valores encontrados (mg/g de mistura)	498,96	408,88
	510,67	410,02
	512,40	397,50
Coefficiente de Variação (%)	1,44	1,71
Média (mg/g)	507,34	405,47
Valor esperado (mg/g de mistura)	500,00	400,00
Porcentagem de recuperação	101,47	101,37

TABELA 33 - Resultados do teor de glucosamina e condroitina para a mistura 24 no ensaio de recuperação

Mistura 24	Glucosamina-6-sulfato	Condroitina-6-sulfato
Valores encontrados (mg/g de mistura)	390,74	322,31
	388,78	325,33
	396,53	319,56
Coefficiente de Variação (%)	1,03	0,90
Média (mg/g)	392,02	322,40
Valor esperado (mg/g de mistura)	400,00	320,00
Porcentagem de recuperação	98,00	100,75

TABELA 34 - Resultados do teor de glucosamina e condroitina para a mistura 25 no ensaio de recuperação

Mistura 25	Glucosamina-6-sulfato	Condroitina-6-sulfato
Valores encontrados (mg/g de mistura)	605,98	316,03
	595,23	329,87
	593,74	324,89
Coefficiente de Variação (%)	1,12	2,17
Média (mg/g)	598,32	323,60
Valor esperado (mg/g de mistura)	600,00	320,00
Porcentagem de recuperação	99,72	101,12

Os valores encontrados estão dentro do intervalo de 98% a 101,47%. Tais valores estão dentro dos limites aceitos pela ANVISA (2003) e pelo ICH (1996), o que demonstra a exatidão do método.

5.7 ANÁLISE DE MEDICAMENTOS

O método desenvolvido e validado foi utilizado para a quantificação de medicamentos manipulados e do medicamento industrializado Artolive®. Os medicamentos manipulados foram adquiridos em três farmácias de manipulação de Curitiba-PR. Para o medicamento industrializado não houve possibilidade de análise de lotes diferentes, pois à época da pesquisa apenas um lote foi encontrado no mercado.

Para todas as análises foram utilizadas 20 cápsulas de cada um dos medicamentos e calculada a concentração correspondente.

Os resultados das análises destes medicamentos estão representados na tabela 35.

TABELA 35 - Resultados de previsão para amostras de medicamentos obtidas no mercado utilizando-se o método desenvolvido e validado

Medicamentos	Concentração declarada mg/g		Concentração encontrada mg/g de mistura		Erro (%)		% do Valor Declarado	
	Glucosamina	Condroitina	Glucosamina	Condroitina	Glucosamina	Condroitina	Glucosamina	Condroitina
Manipulado 1	500,00	400,00	523,45	389,25	- 4,69	2,69	104,69	97,31
Manipulado 2	500,00	400,00	489,14	422,78	2,17	-5,70	97,83	105,69
Manipulado 3	500,00	400,00	490,41	412,71	1,92	3,18	98,08	103,18
Artrolive® análise 1	500,00	400,00	207,94	614,53	58,41	-53,63	41,59	153,63
Artrolive® análise 2	500,00	400,00	210,55	612,35	57,89	-53,09	42,11	153,09

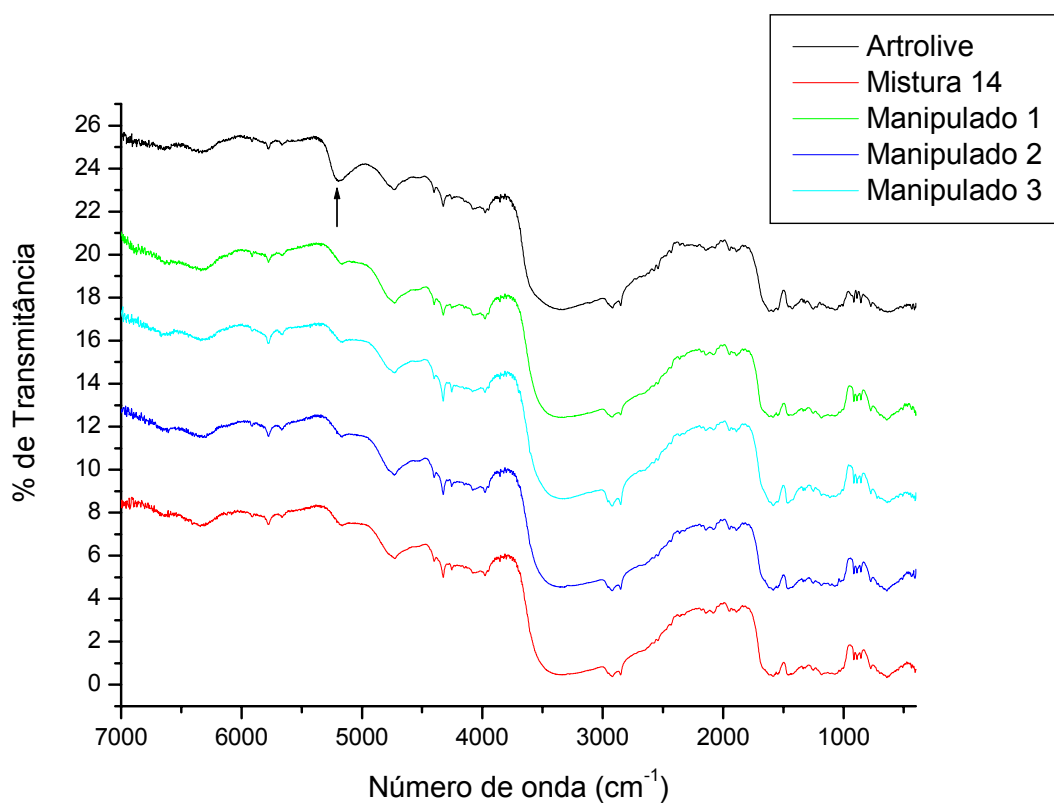
O método desenvolvido teve boa capacidade de previsão para os medicamentos manipulados, apresentando como porcentagem do valor declarado 104,69%, 98,08% e 97,83% para a glucosamina e 97,31%, 103,18% e 105,69% para a condroitina. Tais valores encontram-se dentro do intervalo de valores aceito para a análise de medicamentos conforme monografias farmacopeicas.

Com relação ao produto industrializado, a análise revelou erros de previsão muito altos (53,31% em média para a glucosamina e 41,85% em média para a condroitina).

Neste caso, seria necessária a determinação destes componentes por outro método que possibilitasse a comparação dos resultados, pois assim seria possível concluir se o problema está relacionado ao método ou se, de fato, o medicamento não apresenta as concentrações declaradas. A indústria foi contatada para que se soubesse qual o método utilizado no controle de qualidade deste medicamento, mas, alegando caráter sigiloso, declarou que tal informação não poderia ser disponibilizada.

O resultado de previsão não satisfatório para o medicamento artrolive® pode estar relacionado a alguma diferença em seu espectro em relação ao dos medicamentos manipulados e das misturas utilizadas no desenvolvimento do método. Para identificação destas possíveis diferenças, a figura 39 apresenta o espectro do medicamento industrializado, dos manipulados e de uma mistura sintética.

FIGURA 39 – Espectros no infravermelho com reflectância difusa dos medicamentos manipulados, do medicamento industrializado e da mistura 14



Existe uma banda característica do Artrolive® (apontada na seta) que não está presente de forma tão pronunciada nos espectros dos medicamentos manipulados e nos da mistura 14. Esta região, que corresponde a aproximadamente 5160 cm^{-1} , está relacionada a amidas e carbonila (FERRARINI, 2004).

Partindo-se da análise da figura 39 e dos resultados da tabela 35, algumas hipóteses podem ser levantadas:

- a) Matérias-primas de fornecedores distintos em que os componentes podem apresentar características cristalinas diferentes em função do tipo de sal poderiam estar refletindo nas

características da resposta espectral, na seletividade do modelo e no teor em função do peso molecular do tipo de sal.

- b) Poderia ter ocorrido falha no processo de produção do medicamento do lote analisado, seja por erro de pesagem, perdas no processo de transferência para o misturador ou por mistura incompleta dos pós – mistura não homogênea.
- c) O medicamento industrializado poderia ter algum excipiente além do estearato de magnésio, não declarado na sua monografia.

6 CONCLUSÕES

- A espectroscopia no infravermelho, utilizando-se técnica de reflectância difusa e regressão multivariada, apresentou-se adequado para determinação simultânea de glucosamina sulfato e condroitina sulfato na forma farmacêutica cápsula.
- O modelo de melhor capacidade preditiva foi aquele que considerou os espectros fragmentados das misturas, em que regiões de ruído foram previamente eliminadas e regiões de boa reprodução de bandas, observadas nos espectros das substâncias puras, foram consideradas.
- Informações espectrais contidas na região do infravermelho próximo mostraram-se mais relevantes para o desenvolvimento do método, uma vez que o modelo de melhor desempenho considerou 910 números de onda na região do infravermelho próximo e apenas 156 números de onda no infravermelho médio.
- Os pré-processamentos não se mostraram úteis para melhorar a capacidade preditiva do método. Os modelos construídos com espectros derivados em 1° ordem e alisados e espectros pré-tratados com correção multiplicativa do sinal (MSC) apresentaram erros de previsão maiores do que os erros apresentados pelo modelo desenvolvido com espectros sem pré-processamento.
- O método mostrou-se preciso nos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, exato e seletivo dentro do intervalo estabelecido de 400 mg/g a 600 mg/g para a glucosamina e 320 mg/g a 480 mg/g para a condroitina, com margens de erro e variação dentro das especificações apresentadas em normas nacionais e internacionais.

- Este método, uma vez desenvolvido e validado, mostra-se promissor para utilização na rotina de produção já que as análises tornam-se bastante rápidas, de baixo custo e praticamente sem produção de resíduos que causariam impacto ambiental.

REFERÊNCIAS

ABC DA SAÚDE. **Artrose**. Disponível em <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?310>> Acesso em 12 maio 2005.

ABDI, H.; Partial Least Squares (PLS) Regression. In M. Lewis-Beck, A. Bryman, T. Futing (Eds). Encyclopedia for research methods for the social sciences, 2003.

ANVISA. Resolução nº999 de 29 de maio de 2003 que determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 02 fev. 2003.

ARANCIBIA, J. A.; NEPOTE, A. J.; ESCANDAR, G. M.; OLIVIERI A. C.; Spectrofluorimetric determination of phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol. **Anal Chim Acta**, v.419, p. 159, 2000.

BACHMEIER, C.J.M.; BROOKS, P.M. Osteoarthritis: epidemiological aspects, assessment and treatment. **Rev Bras Reumatol**, v.36, p.379-390, 1996.

BASSLEER, C.; ROVATI, L.; FRANCHIMONT P. Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage in vitro. **Osteoarthritis & Cartilage**, v.6, p.427-434, 1998.

BAXTER, D.C.; ÖHMAN, J. Multicomponent standard additions and partial least squares modeling – a multivariate calibration approach to the resolution of spectral interferences in graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta**, v.45B, p. 481-491, 1990.

BEEBE, K.R. KOWALSKI, B.R. An introduction to multivariate calibration and analysis. **Anal Chim Acta**, v.59, p.1007A-1017A, 1987.

BRAGA, J.W. POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Quim Nova**, v.27, n.6, p.1004-1011, 2004.

BRERETON, R.G. Introduction to Multivariate Calibration in Analytical Chemistry. **Analyst**. v.125, p. 2125-2154, 2000.

CANAPP, S.O. *et al.* Scintigraphic evaluation of dogs with acute synovitis after treatment with glucosamine-chondroitin sulfate. **Am. J. Vet. Res.**, v.60, p.1550, 1999.

CERQUEIRA, E. O.; POPPI, R. J.; KUBOTA, L. T. Utilização de filtro de transformada de fourier para a minimização de ruídos em sinais analíticos. **Quim Nova**, v.23, p.690-698, 2000.

COIMBRA, I.B. *et al.* Consenso brasileiro para o tratamento da osteoartrite (artrose). **Rev Bras Reumatol.**, v.42, p.371-374, 2002.^a

COIMBRA, M.A. *et al.* J. Agric. Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis of white wine polysaccharide extracts. **Food Chem**, v.50, p.3405-3411, 2002.^b

CORRER, C.J. *et al.* Determinação de Ácido Kójico em Produtos Farmacêuticos por Espectroscopia UV-Vis E Processo de Calibração Multivariada. **Acta Farm Bonaerense**, v.24, p. 416-420, 2005.

COSCIONE, A.R. O uso de calibração multivariada para determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro: aplicação na análise de plantas e solos. Campinas, jun. 2001. [Tese de doutorado] Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

DAS, A.K.; HAMMAND, T.A. Efficacy of a combination of FCHG49TM glucosamine hydrochloride, TRH122TM low molecular weight sodium chondroitin sulfate and manganese ascorbate in the management of knee osteoarthritis.

Osteoarthritis Cartilage, v.8, p343-350, 2000.

DAVIDSON, M.W. *et al.* 2005. **Reflection of Light**. Disponível em: <<http://micro.magnet.fsu.edu/optics/lightandcolor/reflection.html>> Acesso em 5 agosto 2005.

DOU, Y. *et al.* Determination of compound aminopyrine phenacetin tablets by using artificial neural networks combined with principal components analysis.

Anal Biochem, v.17, 2005.

FELICE, J.C., *et al.* **Osteoartrose**. Disponível em <<http://cerir.org.br/revistas/setembro2002/osteoartrose.htm>> Acesso em: 15 junho 2005.

FERNANDEZ, R.N. *et al.* Perspectivas terapêuticas para a osteoartrose. **Rev Bras Reumatol**, v.37, p.97-102, 1997.

FERRARINI, H. Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada. Curitiba, dez.2004. [Dissertação de Mestrado]. Mestrado em Química, Universidade Federal do Paraná – UFPR.

FERRÃO, M.F. Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. **Tecno-lógica**, v.5, p.63-85, 2001.

FERREIRA, M.M.C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v.22, p.724-731, 1999.

FILHO, P.A.C.; POPPI, R.J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. **Quim Nova**, v. 25, p. 46-52, 2002.

FOOT, M.; MULHOLLAND, M. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. **J Pharm Biomed Anal**, v.38, p.397-407, 2005.

FULLER, M.P.E; GRIFFITHS,P.R. Diffuse Reflectance Measurements by Infrared Fourier Transform Spectroscopy. **Anal Chem**, v.50, p.1906-1910, 1978.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial least-squares regression: A tutorial. **Anal Chim Acta**, v.185, p.1-17, 1986.

HÄUSELMANN, H.J. Nutripharmaceuticals for osteoarthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v.15, n.4, p. 595-607, 2001.

HARDINGHAM, T.E. *et al.* Cartilage proteoglycans: assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. **Biochem J**, v.253, p.175-185, 1988.

HELLAND, I.S.; NAES, T.; ISAKSSON, T. Related versions of the multiplicative scatter correction method for preprocessing spectroscopy data. **Chemometr Intell Lab Syst**, v.28, p.233-241, 1995.

HINTON, R. *et al.* Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. **Am Fam Physician**, v. 65, p.841-848, 2002.

HUGHES, R; CARR, A. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of glucosamine sulphate as an analgesic in osteoarthritis of knee. **Rheumatology**, v.41, p.279-284, 2002.

ICH. Guidance for Industry. Q2B - Validation of analytical procedures: Methodology. International Conference on Harmonization, 06 nov. 1996.

ICH. Note for Guidance on Validation of Analytical Methods; Methodology., 29 nov. 1995.

INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, 2003.

KALIVAS, J.H.; ROBERTS, N.; SUTTER, J.M. Global Optimization by Simulated Annealing with Wavelength Selection for Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **Anal Chem**, v.61, p. 2024-2030, 1989.

KELLY, G.S. The role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfate in the treatment of degenerative joint disease. **Altern Med Rev**, v. 3, n.1, p. 27-39, 1998.

KRIVÁCSY, Z; HLAVAY, J. Method for the reliable quantitative analysis by diffuse reflectance infrared spectroscopy. **J Mol Struct**, v. 349, p. 289-292, 1995.

LEEB, B.F. *et al.* A meta-analysis of chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis. **J Rheumatol Suppl**, v. 27, p. 205-211, 2000.

LEFFLER, C.T.; PHILIPPI, A.F.; LEFFLER, S.G.; MOSURE J.C. Glucosamine, chondroitin, and manganese ascorbate for degenerative joint disease of the knee or low back: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. **Mil Med**. v.164, p.85-91, 1999.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEITE, F. Validação em análise química. 4ª Ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2002.

LIANG, Y.Z. KVALHEIM, O.M. MANNE, R. White, grey and black multicomponent systems - A classification of mixture problems and methods for their quantitative analysis. **Chemom Intell Lab Syst**, v.18, p. 235-250, 1993.

LORBER, A.; KOWALSKI, B.R. The effect of interferences and calibration design on accuracy: implications for sensor and sample selection. **J Chemom**, v.2, p.67-79,1998.

MADAN, J.; DWIVEDI, A.K.; SINGH, S. **Anal Chim Acta**. V. 538, p.345-353, 2005.

MANKIN, H.J. The Academic Orthopaedic Society: small beginnings. **Orthopedics**, v.15, p.1399-1400,1992.

MARKOPOULOU, C.K.; MALLIOU E.T.; KOUNDOURELLIS, J.E. Application of two chemometric methods for the determination of imipramine, amitriptyline and perphenazine in content uniformity and drug dissolution studies. **J Pharm Biomed Anal**, v. 37, p.249-258, 2005.

MARTENS, H.; NAES, T. Multivariate Calibration, New York, John Wiley & Sons, 1996.

MASSART, D.L. *et al.* **Chemometrics: A Textbook**. Amsterdam: Elsevier, 1988.

MAZIÉRES, B. Le condroïtine sulfate dans le traitement de la gonarthrose et de la coxoarthrose. **Rev Rhum**, v. 59, p.466-471, 1992.

McALINDON, T.E. *et al.* Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assesment and meta-analysis. **JAMA**, v.283, p. 1469-1475, 2000.

McCARTY, M. Z. The neglect of glucosamine as a treatment for osteoarthritis: a personal perspective. **Med Hypoth**, v.42, p.323-328, 1994.

MEDINA, A. R.; FERNANDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; MOLINA-DIAZ, A. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by

means of a FI ultraviolet pls multiptosensing device. **J. Pharm. Biomed. Anal**, v.21, 1999.

MESSERSCHIMIDT, I. Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada. Campinas, Campinas, 1999. [Tese de doutorado] Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

MILLER, C.E. The use of chemometrics techniques in process analytical method development and operation. **Chemom Intell Lab Syst**, v.30, p.11-22, 1995.

MOREIRA,C.; CARVALHO, M.A.P. **Reumatologia - diagnóstico e tratamento**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

OLINGER, J.M.; GRIFFITHS, P.R. Effects of sample dilution and particle size/morphology on diffuse reflection spectra of carbohydrate systems in the near and mid infrared. Part I: single analytes. **Appl Spectrosc**, v.47, p. 687-694, 1993.

ÖZDEMİR, D.; ÖZTÜRK, B. Genetic Multivariate Calibration Methods for Near Infrared (NIR) Spectroscopic Determination of Complex Mixtures. **Turk J Chem** v.28, p. 497- 514, 2004.

PANEL DE EXPERTOS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE REUMATOLOGÍA. Primer documento de consenso de la Sociedad Española de Reumatología sobre el tratamiento farmacológico de la artrosis de rodilla. **Reumatol Clinica**, v. 1, p.38-48, 2005.

PAVELKA, K. *et al*. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomised, placebo-controlled, double-blind study. **Arch Intern Med**, v.162, p.2113-2123, 2002.

REGINSTER, J.Y. *et al.* Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. **Lancet**, v.357, p.247-248, 2001.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v.57, p.1109-1143, 2005.

REY, L.D. *et al.* Prevalência e padrão de envolvimento articular da osteoartrite de mãos na população acima de 50 anos na cidade de Curitiba. **Rev Bras Reumatol**, v.40, p.217-220, 2000.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim Nova**, v.27, p. 771-780, 2004.

RICHY, F. *et al.* Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. **Arch Intern Med**, v.163, p.1514-1522, 2003.

RIMBAUD, D.J. *et al.* Application of wavelet transform to extract the relevant component from spectral data for multivariate calibration. **Anal Chem**, v.69, p. 4317-4323, 1997.

ROVATI, L.C. *et al.* Glucosamin sulfate in gonarthrosis: efficacy in placebo controlled studies. **Rev Esp Reumatol**, v.20 p 231-242, 1993.

SAVITZKY, A.; GOLLAY, M.J.E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Square Procedures, **Anal Chem**. v.36, p.1627-1639, 1964.

SCARMINIO, I.S. *et al.* Calibração multivariada para sistemas com bandas sobrepostas através da análise de fatores do tipo Q. **Quim Nova**. V.21, n.5, p.590-596, 1998.

SENA, M.M.; COLLINS, C.H.; COLLINS, K.E. Aplicação de métodos quimiométricos na especiação de Cc(VI) em solução aquosa. **Quim Nova**, v.24, p.331-338, 2001.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

THOMAS, E.V. A primer on multivariate calibration. **Anal Chem**, v.66, p.795A-804A 1994.

TOWHEED, T.E. Published meta-analyses of pharmacological therapies for oateoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v.11, p. 836-837, 2002.

USP – The United States Pharmacopeia. 24. ed. Rockville: United Stated Pharmacopeial Convention, 2000.

VELOSA, A.P.P.; TEODORO, W.R.; YOSHINARI, N.H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. **Rev Bras Reumatologia**, v.43, p.160-166, 2003.

VERBRUGEN, G.; COEMAERE, S.; VEYS, E.M. Chondroitin sulfate S/DMOAD (structure/disease modifying osteoarthritis (AO) drug) in the treatment of AO of the finger joints. **Osteoarthritis Cartilage**, v.5, p.70-74, 1997.

WEBMD. **X-ray of osteoarthritis of the knee**. Disponível em http://webcenter.health.webmd.netscape.com/hw/health_guide_atoz/zm6052.asp
Acesso em: 12 maio 2005.

WOLD, H. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. **Technometrics**, v.20, p.397-405, 1978.